

**Analyse humoraler und zellulärer Mechanismen
bei der Xenotransplantatabstoßung
im diskordanten Kleintiermodell Meerschweinchen / Ratte**

Von dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Claudia Link

geboren am 02.02.1966, in Mannheim

2000

Referent: Prof. Dr. J. Köhl

Korreferent: Prof. Dr. R. Schwinzer

Tag der Promotion: 14. Dezember 2000

Du bist alt,
wenn Du meinst, alles gefunden zu haben

W. Joop

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Jörg Köhl, Institut für Medizinische Mikrobiologie,
für die Bereitstellung des interessanten Themas, sein unermüdliches Engagement und seine exzellente Betreuung

Herrn Prof. Dr. Reinhard Schwinzer, Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie,
für die Übernahme des Korreferates

Herrn Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann, Institut für Medizinische Mikrobiologie,
für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können

Herrn Dr. Andreas Meyer zu Vilsendorf, Abteilung für Abdominal- und Transplantationschirurgie,
der einen sehr großen Teil der tierexperimentellen Arbeiten durchführte und viele Anregungen lieferte

Herrn Prof. Dr. Dr. Eckhard Nagel, Abteilung für Abdominal- und Transplantationschirurgie,
für die interessante Themenstellung

Frau Tierärztin Ursula Raschke
für die ständige Hilfsbereitschaft insbesondere bei den tierexperimentellen Arbeiten

Herr Sebastian Wyszowski, Frau Dr. Elisabeth Bremer, Frau Uta Frommknecht-Reding und Frau Dr. Jörns für die fachliche Unterstützung

Herrn Prof. Dr. Wonigeit, Abteilung Abdominal- und Transplantationschirurgie,
der mir den Antikörper gegen Ratten NK-Zellen zur Verfügung stellte, sowie den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die Möglichkeit mit ihrer Hilfe den Chromfreisetzungstest durchführen zu können

und nicht zuletzt Nicole Flemme, Michaela Friedrichsen, Dr. Heiko Hawlisch, Tanja Heller, Dr. Axel Kola, Melanie Müller und Mareen Ziegelmann, die durch ihre kollegiale Zusammenarbeit ein angenehmes Arbeitsklima schufen.

Zusammenfassung

Zur Analyse der humoralen und zellulären Mechanismen bei der Abstoßung eines Xenotransplantats wurde das diskordante Kleintiermodell Meerschweinchen (MS)/Ratte gewählt, das der klinisch relevanten Spezieskombination Schwein/Mensch am nächsten kommt.

Die orthotope Lebertransplantation (OLT_X) von MS auf Ratte konnte durch Optimierung der mikrochirurgischen Operationstechnik in Anpassung an die anatomischen Unterschiede zwischen den beiden Spezies in Kombination mit Komplementinhibition durch Cobra Venom Faktor (CVF) und Applikation des Vasodilators Epoprostenol erfolgreich etabliert werden. Da die Leber der Hauptsyntheseort der Komplementfaktoren ist, kann mit Antikörpern das Entstehen eines Hybrid-Komplementsystems nach Xenotransplantation und in der Folge auch die Auswirkungen der Aktivierung dieses Systems analysiert werden. Daher wurden rekombinante Antikörper gegen die MS Komplementproteine C5 und C5a hinsichtlich ihrer diagnostischen und therapeutischen Eignung überprüft. Neben Detektion von C5-Ablagerungen im Gewebe sowie Inhibition der Komplementkaskade konnte mit diesen Antikörpern ein Test zur Konzentrationsbestimmung von C5 entwickelt werden. Somit wurde ein wichtiges Instrumentarium zur Überprüfung der Stoffwechsellistung und der Kompatibilität der von der Leber synthetisierten Komplementfaktoren nach OLT_X geschaffen.

Da sich die OLT_X als chirurgisch sehr anspruchsvoll erwies, wurden die weiteren Untersuchungen der Abstoßungsmechanismen sowie der Einsatz von verschiedenen Behandlungsschemata zu deren Überwindung im gleichen Tiermodell nach heterotoper Herztransplantation (HHT_X) durchgeführt. Neben Komplement spielen auch xenoreaktive natürliche Antikörper (XNA) eine wichtige Rolle. Zur Bestimmung der XNA in Rattenserum wurde ein ELISA gegen MS Membranproteine etabliert, wobei die eingesetzte MS Zelllinie im Vergleich zu verschiedenen primären MS Zellen als Antigenquelle Vorteile aufwies. Der ELISA wurde im folgenden zur Analyse der Effektivität der eingesetzten immunsuppressiven Regime eingesetzt. In Anlehnung an ein im konkordanten System bereits erfolgreich zur Induktion von Toleranz eingesetztes Regime wurden die Empfänger mit einer Kombination aus Komplementinhibitor, B- und T-Zellsuppression, transients Depletion der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und intraportaler Gabe von Donor-Antigen behandelt. Dadurch konnte das Transplantatüberleben im Vergleich zu dekomplementierten Lewis Ratten im Mittel von 17,5 auf 78 Stunden bzw. in Komplement-defizienten PVG/C6- Ratten von 14 auf 103 Stunden verlängert werden. In der Immunhistologie zeigten die Transplantate der so behandelten Tiere praktisch keine Infiltration mit NK-Zellen, obwohl diese in der Zirkulation mittels FACS-Analyse nachgewiesen wurden. Im Chromfreisetzungstest zeigten die regenerierten NK-Zellen gegenüber Lymphoblasten vom MS eine geringere Zytotoxizität im Vergleich zu Maus Lymphoblasten. Diese Daten sprechen für die Induktion einer NK-Zell-Toleranz gegenüber MS Gewebe aufgrund des eingesetzten Regimes.

Schlüsselworte: diskordante Xenotransplantation; Meerschweinchen/Ratte Modell;

Xenoreaktive natürliche Antikörper; Natürliche Killerzellen

3 Abstract

To study the humoral and cellular mechanisms during graft rejection after xenotransplantation the discordant animal model guinea pig (gp) to rat was investigated.

For orthotopic liver transplantation the microsurgical technique was adapted to overcome the anatomical differences between the species. In combination with de complementation using cobra venom factor and with the vasodilator epoprostenol the liver transplantation from gp to rat was successfully established and appears useful to study further questions concerning immunological and functional compatibilities. As the liver is the main source of complement, antibodies would be useful to analyse the development of a hybrid complement system after xenotransplantation and the consequences of the activation this xenogeneic system. Therefore recombinant antibodies against gp C5 and C5a were analysed for diagnostic and therapeutic applications. Beside detection of deposits of C5 in tissue and inhibition of the complement system the antibodies proved useful to determine C5 concentration in serum.

To study the mechanisms during graft rejection as well as possible regimens to overcome the rejection, heterotopic heart transplantation in the gp to rat model was performed. In addition to complement the role of xenoreactive natural antibodies (XNA) was investigated. To determine XNA, an ELISA against gp membrane proteins was established. Compared with primary gp cells the gp cell line JH4 appeared as an useful antigen source. This ELISA was further used to study the power of different immunosuppressive regimens. After treatment of the recipients with a combination of complement inhibition, B- and T-cell suppression, transient depletion of the natural killer cells (NK cells) and intraportal infusion with donor antigen the survival of the transplanted gp heart was prolonged from 17,5 to 78 hours in Lewis rats and from 14 to 103 hours in complement deficient PVG/C6- rats. Immunohistochemical staining revealed almost no infiltrating NK cells. On the other hand circulating NK cells had regenerated as was shown by FACScan analysis. The regenerated NK cells were tested in a chrome release assay and showed a lower cytotoxicity against gp lymphoblasts compared to lymphoblasts of murine origin. These data strongly suggest the induction of a gp-specific NK cell tolerance in this discordant model for xenotransplantation.

Key words: discordant xenotransplantation; guinea pig to rat;
xenoreactive natural antibodies; natural killer cells.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Xenotransplantation	1
1.1.1 Hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR).....	3
1.1.1.1 Das Komplementsystem in der HAR	3
1.1.1.2 Xenoreaktive natürliche Antikörper.....	5
1.1.1.2.1 XNA-produzierende B-Zellen.....	7
1.1.1.3 Aktivierung der Endothelzellen	7
1.1.2 Überwindung der HAR.....	9
1.1.2.1 Inhibition des Komplementsystems	9
1.1.2.2 Reduktion/Depletion der XNA.....	12
1.1.3 Verzögerte Anstoßung eines Xenotransplantats (DXR).....	13
1.1.3.1 Endothelzellaktivierung bei der DXR	14
1.1.3.2 Monozyten in der DXR	15
1.1.3.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bei der DXR.....	16
1.1.4 Akkomodation	18
1.1.5 T-Zell vermittelte Abstoßungsreaktion	19
1.1.6 Toleranz	20
1.1.7 Physiologische Barrieren.....	21
1.2 Ziel der Arbeit.....	22
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte	25
2.1.2 Verbrauchsartikel	28
2.1.3 Chemikalien.....	29
2.1.4 Narkotika und Medikamente.....	32
2.1.5 Lösungen und Puffer	32
2.1.6 Nährmedien.....	38
2.1.7 Antikörper.....	40

2.1.8	Enzyme	40
2.1.9	Bakterienstämme.....	40
2.1.10	Phagemid-Vektoren.....	40
2.1.11	Zelllinien	41
2.1.12	Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	41
2.1.13	Sonstiges	42
2.1.14	Verwendete Tierstämme.....	42
2.2	Methoden	43
2.2.1	Charakterisierung von Proteinen	43
2.2.1.1	Auftrennung von Proteinen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.2.1.2	Silberfärbung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine	43
2.2.1.3	Bestimmung des Proteingehaltes nach der BCA-Methode	44
2.2.2	Aufreinigung und Bestimmung der Aktivität von Cobra Venom Faktor (CVF).....	44
2.2.2.1	Aufreinigung von CVF	44
2.2.2.2	Bestimmung der antikomplementären Aktivität von CVF <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	44
2.2.2.3	Hämolytischer Test.....	45
2.2.3	Charakterisierung und Verwendung von scFvs gegen Meerschweinchen C5	46
2.2.3.1	Sequenzierung	47
2.2.3.2	Unklonierung in den Vektor pCANTAB6	47
2.2.3.2.1	Amplifikation der scFv-Gene in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.2.3.2.2	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA.....	49
2.2.3.2.3	Alkoholfällung von DNA	49
2.2.3.2.4	<i>Sfi</i> I-Verdau.....	49
2.2.3.2.5	<i>Not</i> I-Verdau	50
2.2.3.2.6	Auftrennen von DNA in einem Agarosegel.....	50
2.2.3.2.7	Extraktion des geschnittenen pCANTAB6 Vektors aus einem Agarosegel mit Glasmilchbeads.....	50
2.2.3.2.8	Ligation der scFv-Inserts mit dem Phagemid Vektor pCANTAB6.....	51
2.2.3.2.9	Elektrotransformation der in pCANTAB6 umklonierten scFvs in <i>E.coli</i>	51
2.2.3.2.10	Überprüfung der erfolgreichen Umklonierung.....	51
2.2.3.3	Aufreinigung der MS C5-spezifischen scFvs	52
2.2.3.3.1	Ankonzentrierung löslicher scFvs	52
2.2.3.3.2	Aufreinigung löslicher scFvs über Metallchelate-Chromatographie und Gelfiltration	52

2.2.3.3.3	Aufreinigung solubler scFvs über Affinitätschromatographie an Protein L .	53
2.2.3.3.3.1	Analyse der Protein L-Bindung	53
2.2.3.4	Affinitätsbestimmung der scFvs	54
2.2.3.5	Analyse der Inhibition des Komplementsystems durch scFvs	57
2.2.3.6	Nachweis von MS C5 mittels BIAcore	57
2.2.4	Zellkultur der eukaryonten Zelllinien JH4 und YAC-1 sowie der Hybridomzelllinie 3.2.3	57
2.2.5	Gewinnung von Material aus MS, Maus und Ratte.....	58
2.2.5.1	Narkotisierung und Tötung der Tiere.....	59
2.2.5.2	Organentnahme.....	59
2.2.5.3	Gewinnung von Serum oder Leukozyten aus peripherem Blut.....	59
2.2.5.4	Absorption von B-Zellen aus den Leukozyten mittels Nylonwatte.....	59
2.2.5.5	Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	60
2.2.5.6	Präparation von MS Thrombozyten.....	60
2.2.5.7	Präparation von MS Leber- und Milzzellen.....	61
2.2.6	Analyse von xenoreaktiven natürlichen Antikörpern (XNA)	61
2.2.6.1	Herstellung von Membranextrakten für den Nachweis von XNA	61
2.2.6.2	Nachweis von XNA im ELISA (XNA-ELISA).....	61
2.2.6.3	Immunblot zum Nachweis von MS Antigenen durch Rattenserum	62
2.2.6.3.1	Western Blot der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine	62
2.2.6.3.2	Immunblot.....	62
2.2.7	Analyse von B-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)	63
2.2.7.1	Aufreinigung des Maus anti-Ratte NK-Zellen Antikörpers (mAk 3.2.3)	63
2.2.7.2	Durchflußzytometrische Bestimmung von NK-Zellen und B-Zellen.....	63
2.2.7.3	Chromfreisetzungstest zur Bestimmung der Zytotoxizität von Ratten NK-Zellen.....	64
2.2.7.3.1	Präparation von Milzzellen	65
2.2.7.3.2	Stimulation der Proliferation vonLymphozyten durch Concanavalin A	65
2.2.7.3.3	Markierung der Zielzellen mit Chrom.....	65
2.2.7.3.4	Präparation der Effektorzellen.....	66
2.2.7.3.5	Chromfreisetzungstest	66
2.2.8	Nachweis von MS oder Ratten C3 mittels RT-PCR.....	67
2.2.8.1	Isolation von Gesamt-RNA.....	67
2.2.8.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	68
2.2.8.3	Überprüfung der isolierten Gesamt-RNA im Agarosegel	68
2.2.8.4	Reverse Transkription zur Generierung von cDNA aus Gesamt-RNA	68
2.2.8.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf Ratten oder MS C3	69

2.2.9	Medikamentöse und operative Eingriffe bei Ratten	69
2.2.9.1	Technik der orthotopen Lebertransplantation von MS auf Ratte (OLT _X) ...	69
2.1.9.2	Heterotope Herztransplantation von MS auf Ratte (HHT _X)	70
2.1.9.3	Splenektomie (SP _X).....	71
2.1.9.4	B-Zellsuppression mit Malonitrylamid (MNA)/ Leflunomid	71
2.1.9.5	T-Zellsuppression mit Ciclosporin A.....	71
2.1.9.6	Intraportale Injektion von MS Leberzellen	71
2.1.9.7	Depletion der NK-Zellen.....	71
2.1.10	Tierversuchsgruppen	72
2.2.10.1	Versuchsgruppen und Schemata bei orthotoper Lebertransplantation (OLT _X).....	72
2.1.10.2	Versuchsgruppen und Schemata zur Suppression der zellulären und humoralen Effektorsysteme bei heterotoper Herztransplantation (HHT _X) .	73
2.1.10.3	Versuchsgruppen zur Analyse der XNA	75
2.1.10.4	Versuchsgruppen zur Analyse der B-Zellen und NK-Zellen.....	76
2.1.10.5	Versuchsgruppen zur Analyse von C3 nach intraportaler Infusion mit MS Leberzellen	77
2.1.11	Histopathologische und immunhistochemische Analyse der Transplantate.....	78
2.2.11.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	78
2.1.11.2	Nachweis von Apoptose.....	78
2.1.11.3	Immunhistochemische Analyse.....	78
2.1.11.3.1	Detektion von C5 Ablagerungen nach <i>in situ</i> xenogener Herzperfusion...	79
2.1.11.3.2	Detektion der Infiltration mit Makrophagen oder NK-Zellen sowie Ablagerungen von IgM oder Komplementproteinen der Ratte	79
3	Ergebnisse.....	81
3.1	Aufreinigung und Aktivitätsbestimmung von Cobra Venom Faktor (CVF)	81
3.1.1	Aufreinigung von CVF	81
3.1.2	Überprüfung der antikomplementären Aktivität von CVF.....	82
3.2	Charakterisierung und Verwendung von Antikörpern gegen die MS	
	Komplementproteine C5 und C5a	85
3.2.1	Aufreinigung der anti-MS C5 scFvs.....	86
3.2.2	Affinitätsbestimmung.....	90
3.2.3	Inhibition der Komplementaktivität	91
3.2.4	Konzentrationsbestimmung von C5 im MS Serum	92

3.2.5	Detektion von MS C5-Abalgerungen im Gewebe nach heterotoper Herztransplantation von Ratte auf MS.....	93
3.3	Etablierung des Modells der diskordanten orthotopne Lebertransplantation (OLT _X).....	93
3.3.1	Überleben und Physiologie der Transplantate nach OLT _X	93
3.3.2	Apoptose und Immunhistologie der MS Leber nach OLT _X	95
3.4	Heterotopie Herztransplantation von MS auf Ratte (HHT _X).....	97
3.4.1	Überleben und Immunhistologie der MS Herzen nach HHT _X	98
3.4.2	Densiometrische Analyse der Infiltration mit Makrophagen und NK-Zellen in abgestoßenen MS Herzen.....	102
3.5	Analyse von xenoreaktiven natürlichen Antikörpern (XNA).....	103
3.5.1	Präparation von Membranextrakten aus MS Zellen.....	104
3.5.2	Analyse von XNA in unbehandelten Lewis und PVG/C6- Ratten im ELISA.....	105
3.5.3	Analyse der von unbehandelten Ratten erkannten MS Antigene im Immunblot.....	105
3.5.4	Einfluss verschiedener Behandlungsschemata auf zirkulierende XNA....	107
3.6	Untersuchung der zirkulierenden B-Zellen mittels Durchflußzytometrie	108
3.7	Analyse zirkulierender NK-Zellen	113
3.7.1	Durchflußzytometrische Bestimmung von Ratten NK-Zellen	115
3.7.1.1	Bedingungen der Fluoreszenzfärbung zur durchflußzytometrischen Bestimmung von NK-Zellen.....	115
3.7.1.2	NK-Zellen in unbehandelten Ratten	116
3.7.1.3	NK-Zellen in Ratten nach transienter Depletion.....	116
3.7.2	Chromfreisetzungstest zur Bestimmung der Zytotoxizität von Ratten NK-Zellen.....	117
3.7.2.1	Stimulation der Lymphozyten aus Milzzellen mit Concanavalin A (Con A)118	
3.7.2.2	NK-Zell-Zytotoxizität nach transienter Depletion.....	122
3.8	Nachweis von MS oder Ratten C3 mittels RT-PCR.....	123
4.	Diskussion	127
4.1	Orthotopie Lebertransplantation von MS auf Ratte (OLT _X).....	127
4.1.1	Etablierung der Technik der OLT _X von MS auf Ratte.....	128
4.1.2	Immunologische und molekulare Kompatibilität nach Leberxenotransplantation.....	129

4.1.2.1	Aufreinigung und Charakterisierung der Antikörper gegen MS Komplementprotein C5	130
4.1.2.2	Inhibition des Komplementsystems durch MS C5-spezifische Antikörper	132
4.1.2.3	C5-Konzentrationsbestimmung im Serum	132
4.1.2.4	Detektion von C5-Ablagerungen im Gewebe	133
4.2	Heterotpe Herztransplantation (HHTX) von MS auf Ratte	134
4.2.1	Inhibition des Komplementsystems zur Überwindung der HAR	134
4.2.1.1	Komplementinhibition durch Cobra Venom Faktor (CVF)	134
4.2.1.2	Komplementinhibition durch Einsatz Komplement-defizienter Empfänger	135
4.2.2	Xenoreaktive natürliche Antikörper (XNA)	136
4.2.2.1	Nachweis von XNA	136
4.2.2.2	Reduktion der XNA	138
4.2.2.3	Transplantatüberleben nach Reduktion der XNA	139
4.2.3	Induktion von B- und NK-Zell-Toleranz durch Einsatz verschiedener immunsuppressiver Regime	140
4.2.3.1	Infusion mit Donor-Antigen	141
4.2.3.2	Überprüfung der Zirkulation oder Absiedlung der Donor-Zellen	141
4.2.3.3	Transplantatüberleben nach Schemata zur Induktion von Toleranz	142
4.2.3.4	Analyse der XNA und der zirkulierenden B-Zellen unter dem zur Induktion von Toleranz eingesetzten Behandlungsschema	144
4.2.3.5	Analyse der NK-Zellen unter dem zur Induktion von Toleranz eingesetzten Behandlungsschema	145
4.3	Ausblick	148
5.	Literaturverzeichnis	150
6.	Anhang	179
6.1	Sequenzen der Primer zur Amplifikation der scFvs	179
6.2	Sequenzen der Primer für die RT-PCR auf Ratten bzw. MS C3	180
6.3	DNA Sequenzen der scFvs gegen MS C5 (B3, E10, F11 und H10 und gegen MS C5a (D10))	181
6.3.1	Schwere Ketten	181
6.3.2	Leichte Ketten	183

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	Phasen der Abstoßung eines diskordanten Xenotransplantats mit den beteiligten Mediatoren	2
Abb. 2.	Schematische Darstellung der Komplementkaskade.....	5
Abb. 3 .	Schematische Darstellung der Typ 1 Endothelzell-Aktivierung und der 8 hyperakuten Abstoßung	8
Abb. 4 .	Schematische Darstellung der Typ 2 Endothelzell-Aktivierung und der verzögerten Abstoßung.....	15
Abb. 5 .	Funktionsprinzip einer BIAcore Messung	55
Abb. 6.	Aufreinigung von Cobra Venom Faktor (CVF).....	82
Abb. 7.	Antikomplementäre Aktivität von CVF <i>in vivo</i>	84
Abb. 8.	Aufreinigung des mit Sfil und NotI verdauten Phagemid Vektors pCANTAB6 über ein DNA-Agarosegel	87
Abb. 9.	Aufreinigung von MS C5-spezifischen scFvs über Metallchromatographie und Gelfiltration.....	88
Abb. 10.	Aufreinigung der MS C5-spezifischen scFvs über Protein L.....	89
Abb. 11.	Inhibition der Hämolyse durch MS C5-spezifische scFvs	91
Abb. 12.	Bestimmung der MS C5-Konzentration im Serum unter Verwendung der MS C5-spezifischen scFvs E10 in der Surface Plasmon Resonance Analyse (SPR)	92
Abb. 13.	Detektion von MS C5 in Rattenherzen nach Xenotransplantation	93
Abb. 14.	Überleben nach Transplantation einer MS Leber auf Ratte	94
Abb. 15.	Apoptotische Kerne in MS Leber nach Xenotransplantation.....	96
Abb. 16.	Immunhistochemie der MS Leber nach Xenotransplantation.....	97
Abb. 17.	Überleben der heterotop auf Ratte transplantierten MS Herzen	100
Abb. 18.	Immunhistologie der abgestoßenen MS Herzen nach Transplantation auf Lewis Ratten der Gruppe E und H.....	101
Abb. 19.	Infiltration der abgestoßenen MS Herzen mit Makrophagen (A) und NK-Zellen (B) nach HHTX.....	103
Abb. 20.	Xenoreaktive IgG und IgM Antikörper eines PVG/C6- Serums gegen Membranextrakte der MS Zelllinie JH4 im ELISA.....	104
Abb. 21.	Xenoreaktivität der XNA von Lewis (A) und PVG/C6- Ratten (B) im ELISA....	105
Abb. 22.	Xenoreaktivität der IgG und IgM XNA von 10 individuellen PVG/C6- Ratten im ELISA gegen den Membranextrakt der JH4 Zelllinie	106
Abb. 23.	Xenoreaktivität der XNA im Immunblot.....	107
Abb. 24.	XNA Nach B-Zellsuppression.....	108

Abb. 25. XNA-Spiegel in Prozent nach Infusion mit Donorantigen ohne (A) und mit vorheriger Splenektomie und B-Zellsuppression (B).....	108
Abb. 26. XNA vom IgG- (A) und IgM-Isotyp (B) in den Lewis Ratten der Gruppe H und PVG/C6- Ratten der Gruppen K und L	112
Abb. 27. Durchflußzytometrische Analyse der B-Zellen (CD45) und der CD5+ B-Zellen (CD5/CD45) in je 5 Lewis (A) und PVG/C6- Ratten (B) der Gruppen O und P	114
Abb. 28. NK-Zellanteil von je 5 Lewis (Gruppe O) und PVG/C6- Ratten (Gruppe P) nach transienter NK-Zell-Depletion	118
Abb. 29. Überprüfung der Lymphozytenproliferation im Mikrotitermaßstab.....	119
Abb. 30. Überprüfung der Lymphozytenproliferation in Zellkulturflaschen	120
Abb. 31. Lyse von Con A stimulierten Lymphoblasten aus Maus Milz oder MS Milz und Lymphknoten durch Ratten NK-Zellen.....	121
Abb. 32. Prozentuale Lyse der YAC1-, MS und Maus Blasten durch PMBCs der PVG/C6- Ratten aus Gruppe P	122
Abb. 33. Aus Rattenleber isolierte Gesamt-RNA im Agarosegel.....	124
Abb. 34. PCR mit unterschiedlichen Primern aus MS (A) und Ratten cDNA (B).....	125
Abb. 35. Bestimmung der Anweisgrenze der RT-PCR auf MS (A) oder Ratten (B) C3.....	125

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Versuchsgruppen und Schemata bei orthotoper Lebertransplantation (OLT)X) ...	72
Tab. 2. Versuchsgruppen und Schemata zur Suppression der zellulären und humoralen Effektorsysteme bei heterotoper Herztransplantation	74
Tab. 3. Versuchsgruppen zur Analyse der XNA.....	76
Tab. 4. Versuchsgruppen zur Analyse der B- und NK-Zellen.....	76
Tab. 5. Subgruppierung der MS C5- und C5a-spezifischen scFvs.....	86
Tab. 6. Affinitäten und Bindungskinetiken von MS C5-spezifischen scFvs.....	90
Tab. 7. Überleben und Immunhistologie der Lebertransplantate nach orthotoper Transplantation von Dunkin Hartley MS auf Lewis Ratten (OLT)X).....	95
Tab. 8. Auswirkung verschiedener Behandlungsschemata auf die Transplantatabstoßung nach heterotoper Herztransplantation (HHTX).....	99

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACD	Acid-Citrat-Dextrose
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Tissue Culture Collection
bp	Basenpaare (base pairs)
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5- Brom-4chlor-3indolylphosphat-p-toluidinsalz
BSA	Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin)
<i>Bst</i> N1	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>
C	Cytosin
Ci	Curie
Con A	Concanavalin A
CMC	Carboxymethylcellulose
cpm	Zählereignisse pro Minute (counts per minute)
CsA	Ciclosporin A
CVF	Cobra Venom Faktor
Da	Dalton
DEA	Diethanolamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
DXR	verzögerte Abstoßung (delayed xenograft rejection)

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Durchflußzytometer (Fluorescence activated cell sorter)
Fc	konstante Region eines Immunglobulins (Fragement crystallizable)
FCS	Serum aus fetalen Kälbern (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL 1	Fluoreszenz 1
FL 2	Fluoreszenz 2
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FSC	Durchlichtmessung im Durchflußzytometer, Maß für die Zellgröße (forward scatter)
Fv	variable Regionen eines Immunglobulins (Fragment variability)
G	Guanin
Gluk	Glukose
HAR	hyperakute Abstoßung (hyperacute xenograft rejection)
HEPES	N'-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HHTX	heterotope Herzxenotransplantation
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IU	Internationale Einheit (international unit)
Lef	Leflunomid
MAC	Membran-Angriff-Komplex (membrane attack complex)
mAk	monoklonaler Antikörper
MNA	Malonitrylamid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Meerschweinchen

NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschlorid
NHS	Normales humanes Serum
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
<i>NotI</i>	Restriktionsenzym aus <i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
OD	optische Dichte
OLTX	orthotope Leberxenotransplantation
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
<i>pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
PNPP	p-Nitrophenylphosphat
POX	Peroxidase
PRP	plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institut, Medium
scFv	über ein Peptid miteinander verknüpfte variable Regionen eines Immunglobulins (single chain Fv)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
<i>SfiI</i>	Restriktionsenzym aus <i>Streptomyces fimbriatus</i>
SSC	Streulichtmessung im Durchfluß-Zytometer, Maß für den Grad der Granularität (side scatter)
SPX	Splenektomie

T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris gepufferte Saline (Tris buffered saline)
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylenglykol-20-sorbitolmonolaurat
VBS	Veronal gepufferte Saline
V _H	variable Region der schweren Kette (variable domain of the heavy chain)
V _L	variable Region der leichten Kette (variable domain of the light chain)

1 Einleitung

1.1 Xenotransplantation

Der Ersatz eines nicht mehr ausreichend funktionsfähigen Organs durch Übertragung zwischen genetisch differenten Individuen der gleichen Spezies (Allotransplantation) hat innerhalb der letzten 30 Jahre rasche Fortschritte gemacht und gehört heute in erheblichem Umfang bereits zur Standardtherapie. Allerdings herrscht weltweit ein Mangel an Organen, der es nicht mehr erlaubt, jeden Patienten mit einem Transplantat zu versorgen. So stehen in den USA und Großbritannien etwa 3mal so viele Patienten auf der Warteliste als Transplantationen aufgrund fehlender Spenderorgane durchgeführt werden können (United Network for Organ Sharing; United Kingdom Transplant Support Services Association, 1998). Eine mögliche Lösung für dieses Problem ist die Organtransplantation zwischen verschiedenen Spezies, die Xenotransplantation (Für eine Zusammenfassung s. Auchincloss und Sachs, 1998; Saadi und Platt, 1998; White und Nicholson, 1999; Soin *et al.*, 2000).

Aufgrund von ähnlichen physiologischen und morphologischen Charakteristika wären die großen Primaten, wie z. B. Schimpanse, geeignete Organspender für den Menschen. Dagegen sprechen allerdings die zunehmende Gefährdung dieser Tierarten und ihre langsame Reproduktionsrate. Deshalb wurde nach Alternativen gesucht (Balner, 1974). Als potentieller Spender für den Menschen wird aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen das Schwein favorisiert. Die Schweinehaltung und -schlachtung für den menschlichen Verzehr findet in vielen Kulturen Akzeptanz (Caplan, 1992). Die Schweineaufzucht in Gefangenschaft ist erprobt und die hohe Reproduktionsrate - Schweine können nach Erreichen der sexuellen Reife im Alter von 6 Monaten alle 3 bis 4 Wochen bis zu 20 Ferkel werfen (Niekrasz *et al.*, 1992) - kann eine ausreichende Versorgung mit Organen gewährleisten, falls die diskordante Transplantation eine realistische klinische Therapie würde. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der genetischen Veränderung von Schweinen mit Technologien, die aus praktischen Gründen nicht an Primaten eingesetzt werden können.

Im folgenden soll auf die Transplantation primär vaskularisierter Organe eingegangen werden, d.h. die artfremden Organe, wie Herz, Niere, Leber oder Lunge müssen bei der Transplantation direkt an die Blutgefäße des Empfängers angeschlossen werden, um ihre Funktion aufnehmen zu können. Im Gegensatz dazu stehen sekundär vaskularisierte Xenotransplantate, wie artfremde Inselzellen oder Haut, die erst im Laufe der Zeit Anschluss an die Blutbahn des Empfängers finden und dementsprechend andere biologische Reaktionen hervorrufen.

Je nach genetischem Unterschied zwischen Spender und Empfänger kommt es aufgrund immunologischer Differenzen zu verschiedenen Abstoßungsreaktionen von vaskularisierten Organen. So kommt es nach Transplantation zwischen phylogenetisch weit entfernten Spezies zu einer sehr schnell erfolgenden, hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR: **H**yper**A**cute **R**ejection) mit sofortiger Organzerstörung innerhalb weniger Minuten oder Stunden, ohne dass das Organ seine Funktion aufnehmen konnte (Abb. 1). Nach Calne (1970) wird eine solche Situation, die in der Kombination Schwein/Primat vorliegt, als diskordant bezeichnet. Im Gegensatz dazu wird ein konkordantes Transplantat, wie z. B. in der Kombination Primat/Mensch weniger schnell, ähnlich wie ein Allotransplantat im Rahmen der sogenannten akuten vaskulären (AVR: **A**cute **V**ascluar **R**ejection) oder verzögerten Abstoßung (DXR: **D**elayed **X**enograft **R**ejection) abgestoßen. Um die Mechanismen der Abstoßungsreaktionen in der diskordanten Spezieskombination Schwein/Primat zu untersuchen, wird häufig das ebenfalls diskordante Tiermodell Meer-schweinchen (MS)/Ratte eingesetzt (Jamieson, 1974; Candinas *et al.*, 1996b; Hancock *et al.*, 1997; Miki *et al.*, 1998).

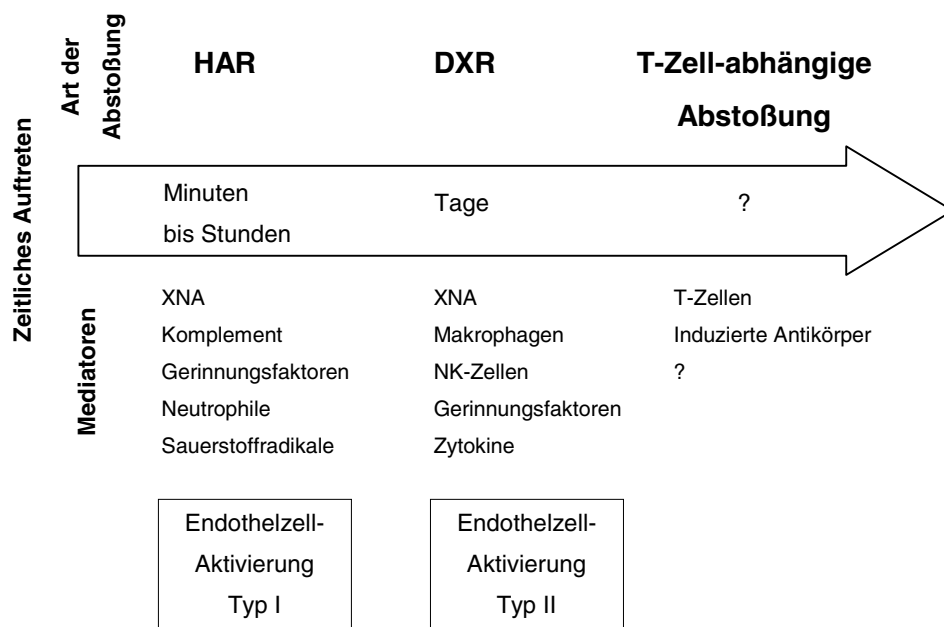


Abb. 1. Phasen der Abstoßung eines diskordanten Xenotransplantates mit den beteiligten Mediatoren. Nach Überwindung der hyperakuten Abstoßung (HAR) unterliegt das Transplantat meist einer verzögerten Abstoßung (DXR). Wird auch diese überwunden, kommt die T-Zell-abhängige Abstoßung zum Tragen. XNA: xenoreaktive natürliche Antikörper.

1.1.1 Hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR)

Die Xenontransplantation in der diskordanten Situation führt zur hyperakuten Abstoßung des Transplantats, das interstitielle Blutungen, Ödeme, Thromben aus Blutplättchen und starke Schädigung der Endothelzellen aufweist (Mollnes und Fiene, 1999). Diese Veränderungen erscheinen fast sofort nach Reperfusion des Organs mit Blut des Empfängers und führen zum schnellen Verlust der Organfunktion. Die fulminante Abstoßungsreaktion wird durch die vorhandene Existenz einer humoralen Immunität des Empfängers gegen den Spender verursacht. Als beteiligte Komponenten wurden das Komplementsystem, natürliche xenoreaktive Antikörper und die Aktivierung von Endothelzellen identifiziert.

1.1.1.1 Das Komplementsystem in der HAR

Das Komplementsystem ist ein multifaktorielles, in seinen zentralen Anteilen enzymatisches Kaskadensystem, bestehend aus über 30 Aktivator- und Regulatorproteinen in Serum und Gewebe (Bitter-Suermann und Köhl, 1997, Abb. 2). Es ist ein konstanter Teil des Immunsystems und übernimmt Abwehrleistungen im Sinne einer unspezifischen humoralen Immunabwehr in der Präimmunphase einer Infektion durch die Zerstörung von Zellen durch Bildung eines lytischen Membranangriff-Komplexes (MAC: **M**embrane **A**ttack **C**omplex). Eine weitere wichtige Funktion des Komplementsystems besteht in der Clearance von Antigen-Antikörperkomplexen durch Opsonierung mit folgender Phagozytose. Zudem ist das Komplementsystem ein Bindeglied zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort, da aktivierte Spaltprodukte, sog. Anaphylatoxine, Signalfunktionen für Zellen des Immunsystems besitzen.

Die Aktivierung des Komplementsystems kann über 3 unterschiedliche Wege erfolgen. Beim klassischen Weg, bei dem über die Komplementfaktoren C1, C4 und C2 letztendlich C3 aktiviert wird, erfolgt die Aktivierung im wesentlichen durch Antigen-gebundene Immunglobuline (Fc-Teile von IgG und IgM), aber auch durch Zellwandproteine (z.B. Protein A von *Staphylococcus aureus*), Lipid A der Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, durch das bei entzündlichen Reaktionen im Serum ansteigende C-reaktive Protein (CRP) und durch Retroviren. Die Auslösung des alternativen Weges, der über die Faktoren C3, Faktor B, Faktor D und Properidin wie der klassische Weg zur Aktivierung von C3 führt, erfolgt durch Oberflächenstrukturen von Bakterien, z.B. Membranpolysaccharide grampositiver Bakterien oder dem Polysaccharid-Anteil des LPS gramnegativer Bakterien, und durch Viren. Der dritte Weg der Komplementaktivierung, der Mannose-bindende-Lektin Weg (MBL), wurde erst kürzlich bekannt. Hierbei verläuft die Aktivierung nach Bindung an Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche analog zum klassischen Weg, mit dem Unterschied, dass C1 durch einen Komplex aus MBL-MASP1-MASP2 (MASP: Mannan Binding Lectin Associated Serin Protease) ersetzt ist. Alle drei Aktivierungswege münden in einen gemeinsamen terminalen Weg, der von den Komponenten C5,

C6, C7, C8 und C9 gebildet wird. Am Ende der Komplementkaskade steht die Bildung eines C5b-C9 Membran-Angriffkomplexes (MAC). Die Bildung des MAC wird durch Assoziation der Komplementproteine C5b, C6, C7 und C8 (C5b-C8) initiiert. Lagert sich der C5b-C8 Komplex an Membranen an, wird er zum Kondensationszentrum für hydrophile C9 Moleküle, von denen sich 6 bis 12 Stück zu einem Hohlzylinder vereinigen und den eigentlichen MAC C5b-9 bilden. Dieser Komplex durchdringt die Zellmembran und zerstört somit die selektive Permeabilität und leitet die Lyse der Zelle ein. Aber auch die Ablagerung des C5b-C8 Komplexes alleine führt über eine Aktivierung der Makrophagen zur Zerstörung der Zelle.

Während der Komplementkaskade werden die Anaphylatoxine C3a und C5a durch proteolytische Spaltung am N-Terminus der α -Kette ihrer Muttermoleküle C3 und C5 sowie dessen C-terminales Abbauprodukt C5a_{desArg} gebildet. Die Anaphylatoxine sind potente Entzündungsmediatoren, da sie neben spasmogenen, vasopermeabilitätssteigernden, chemotaktischen und aggregierenden Eigenschaften nach Bindung an entsprechende Rezeptoren auch die Freisetzung vasoaktiver Peptide, z.B. Histamin und Serotonin aus Mastzellen und basophilen Leukozyten, sowie die Freisetzung von lysosomalen Enzymen, toxischen Sauerstoffmetaboliten und von Arachidonsäurederivaten (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene) aus Granulozyten, Monozyten und Makrophagen verursachen (Ember *et al.*, 1998).

Das Komplementsystem spielt auch während der HAR bei der Xenontransplantation eine essentielle Rolle (für eine Zusammenfassung s. Saadi und Platt, 1999). So kommt es nach Anastomose eines diskordanten Xenotransplantats zu einer steilen Abnahme des Serumspiegels an Komplementkomponenten (Gewurz *et al.*, 1967; Busch *et al.*, 1975) und gleichzeitig zur Akkumulation im Transplantat (Platt *et al.*, 1991).

Im Modell Schwein/Primat wird die Aktivierung des Komplements über den klassischen Weg durch Bindung xenoreaktiver Antikörper an die Oberfläche des fremden Organs verursacht (vgl.1.1.1.2). In anderen Tiermodellen, wie bei der Spezieskombination MS/Ratte, kommt es neben der Aktivierung des klassischen Weges hauptsächlich zu einer Aktivierung über den alternativen Weg. So zeigten Miyagawa *et al.* (1988), dass während der HAR eines MS Herzens nach Xenotransplantation in Ratten eine signifikante Reduktion der hämolytischen Komplementkomponenten im Rattenserum auftrat, ohne dass es zu einem Verbrauch der Faktoren C2 und C4 kam. Miyagawa entdeckte aber auch keine anti-MS Antikörper in Gegensatz zu anderen Arbeiten (Leventhal *et al.*, 1992b). Die Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg führt zu einer fulminanten Abstoßung innerhalb weniger Minuten aufgrund der schnellen und vor allem uniformen Aktivierung an der Fremdoberfläche, unabhängig von der Kinetik einer Antikörper-Antigen-Interaktion.

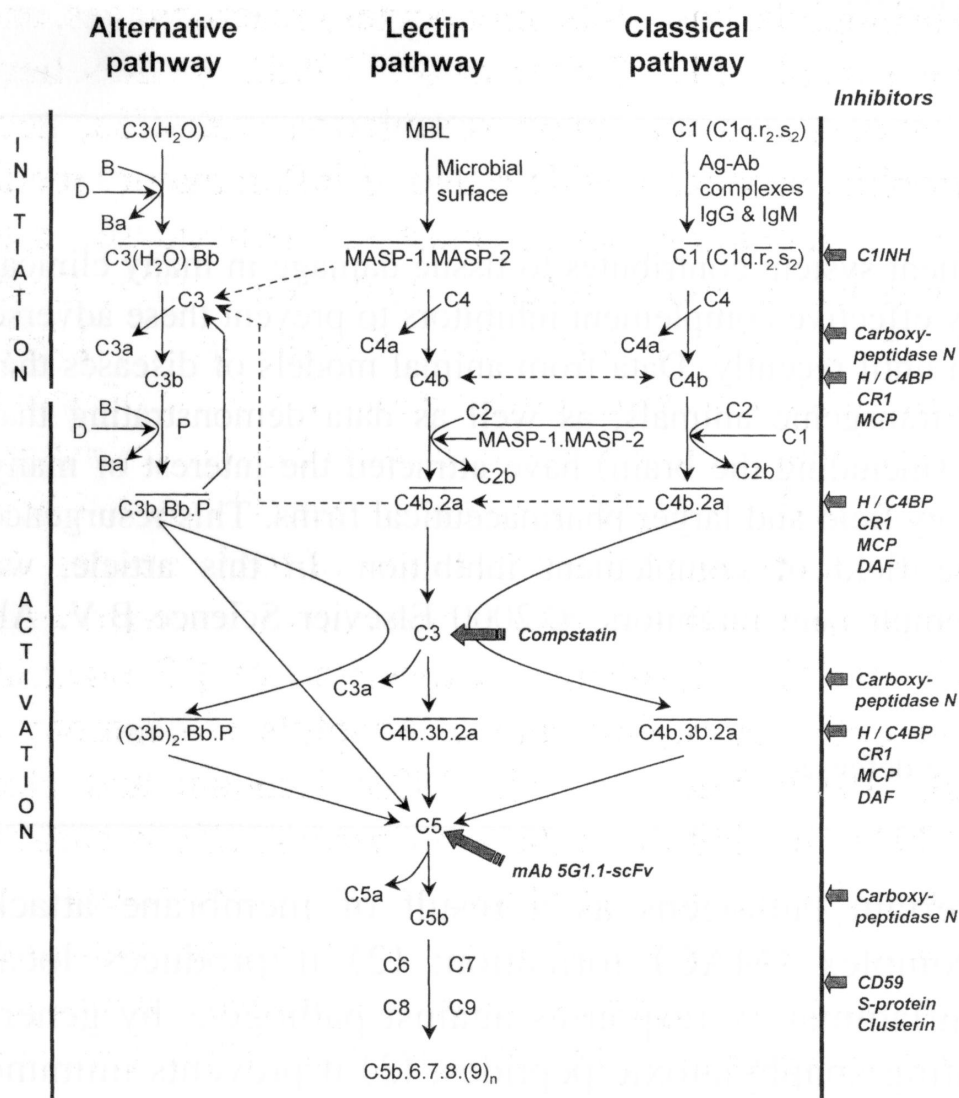


Abb. 2. Schematische Darstellung der Komplementkaskade.

Quelle: Sahu und Lambris, 2000.

1.1.1.2 Xenoreaktive natürliche Antikörper (XNA) bei der HAR

Eine weitere wichtige Komponente während der HAR bei Xenontransplantation im diskordanten Tiermodell ist das Vorhandensein präformierter, gegen Zelloberflächen des Spenders gerichteter Antikörper im Empfänger (XNA: Xenoreaktive Natural Antibodies). Alle Säugetiere besitzen natürliche Antikörper, die ohne bekannte Sensibilisierung synthetisiert werden (Boyden, 1964; Hammer, 1989), darunter auch solche, die an die Oberfläche von Zellen völlig unverwandter Spezies ohne vorherige Immunisierung binden (Platt *et al.*, 1990a; White, 1999).

Der Einfluss der XNA bei der Immunpathogenese der HAR wurde durch folgende Beobachtungen bestätigt: 1. XNA lagern sich schnell in einem Xenotransplantat ab (Giles *et al.*, 1970; Platt *et al.*, 1991). 2. Eine Depletion der XNA verhindert die HAR eines nachfolgend xenotransplantierten Organs (Perper und Najarian, 1966; Rose *et al.*, 1991). 3. In einigen Spezieskombinationen tritt keine HAR auf, wenn ein neugeborener Empfänger verwendet wird, der noch keine XNA besitzt (Kaplon *et al.*, 1995). Und 4. Die HAR kann durch die Gabe von XNA in den Xenotransplantat-Empfänger induziert werden (Perper und Najarian, 1967).

Bei der Kombination Schwein/Primat spielen die XNA eine Schlüsselrolle durch Aktivierung der klassischen Komplementkaskade bei der HAR während der Xenotransplantation. Das Hauptepitop humaner präformierter XNAs auf Schweineorganen ist das Zuckerepitop Galaktosyl α 1-3 Galaktose (Gal α 1-3Gal) (Galili *et al.*, 1984; Galili, 1993, Oriol *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1995). Die Synthese dieses Zuckerepitops wird durch das Enzym α 1,3-Galaktosyltransferase katalysiert, das in den Zellen aller niedrigeren Säugetiere und der Neuen Welt Affen vorhanden ist. Menschen, Menschenaffen und Alte Welt Affen hingegen exprimieren dieses Enzym nicht und besitzen damit auch keine entsprechenden Zuckerepitope (Galili *et al.*, 1988). Es wird angenommen, dass zirkulierende XNA eine humorale Abwehr gegen Bakterien der Darmflora bilden, welche ebenfalls Gal α 1-3Gal Epitope besitzen und so einen initialen Abwehrmechanismus gegen invasive Mikroorganismen bilden (Casali und Notkins, 1989).

In der Spezieskombination Schwein/Primat binden diese XNA der Primaten an die Endothelzellen des Transplantats und aktivieren zum einen Komplement über den klassischen Weg, zum anderen führen sie zu einer direkten Aktivierung der Endothelzellen.

Im Gegensatz zur Kombination Schwein/Primat spielen die XNA bei der HAR in dem Kleintiermodell Meerschweinchen (MS)/Ratte wohl nicht die gleiche zentrale Rolle, da die Entfernung der XNA alleine eine HAR nicht verhindern kann (Leventhal *et al.*, 1992a; Miyagawa *et al.*, 1988). Allerdings ist bekannt, dass Ratten anti-MS Antikörper besitzen, die auch im ELISA gegen Membranextrakte aus MS Thrombozyten oder gegen kultivierte MS Endothelzellen nachgewiesen werden können (Platt *et al.*, 1990a; Leventhal *et al.*, 1992b).

Bei der HAR im MS/Ratte Modell scheinen die XNA vom IgM-Isotyp wie bei der Kombination Schwein/Primat eine größere Rolle zu spielen, da sie als Ablagerungen im abgestoßenem Transplantat gefunden werden und nach Depletion mit einem anti- μ Antikörper ein verlängertes Transplantatüberleben erzielt wird (Soares *et al.*, 1994). Welche Zielepitope von den XNA der Ratten an MS Zelloberflächen erkannt wird, ist im Gegensatz zur Situation Schwein/Primat noch nicht eindeutig geklärt. Calmus *et al.* (1993) berichteten, dass anti-MS IgM und IgG Antikörper der Ratte mehrere Proteine unterschiedlicher Molekulargröße aus Homogenaten von MS Lunge, Niere, Leber oder Herz erkannten. Scherrer *et al.* (1994) schlossen aus, dass es sich im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Schwein/Primat bei den von Ratten anti-MS Anti-

körpern mehrheitlich erkannten Epitopen um N-glykosidische Kohlenhydratgruppen auf Membranglykoproteinen handelt. Zwei Jahre später wurde das Forssman Antigen als eines der Hauptziele der Ratten anti-MS Antikörper postuliert (Cairns *et al.*, 1996).

1.1.1.2.1 XNA-produzierende B-Zellen

Die B-Zellen, die XNA produzieren, haben eine Anzahl einzigartiger Eigenschaften (Avrameas und Ternynck, 1993). Sie gehören wahrscheinlich zu den B1 B-Zellen im Gegensatz zu den herkömmlichen B2 B-Zellen, die für die erworbene Antikörperantwort verantwortlich sind (Herzenberg *et al.*, 1992). Die B1 B-Zellen, die das Antigen LY-1 exprimieren, werden noch einmal unterteilt in die B1a (CD5+) und B1b (CD5-) Zellen (Kantor und Herzenberg, 1993). Die B1 B-Zellen zeigen eine Polyspezifität gegen gewöhnliche bakterielle Polysaccharide, neigen zur Bindung an repetetive Autoantigene, wie z.B. doppelsträngige DNA, und halten sich lange Zeit durch Selbstreplikation im peripheren Gewebe, vor allem im Peritoneum und Pleuralhöhle. Im Vergleich zu den konventionellen B2 B-Zellen sind die VDJ-Verknüpfungen weniger vielfältig. Ob die B1 und B2 Zellen zwei unterschiedliche Zelllinien darstellen oder aufgrund unterschiedlicher Differenzierungswege entstanden sind, ist noch ungeklärt (Haughton *et al.*, 1993). Den CD5+ Zellen wird die Immunantwort gegen Thymus-unabhängige (TI: thymus independant) Antigene zugesprochen, d.h. die Stimulation der B-Zellen erfolgt ohne Hilfe der T-Zellen (Kasarian *et al.*, 1992). Zu diesen Antigenen zählen auch solche mit repetetiven Epitopen, wie z.B. Polysaccharide (Teutsch *et al.*, 1995), die von einigen XNAs erkannt werden (Sandrin und McKenzie, 1994). Schettino *et al.* (1997) konnten nachweisen, dass die Produktion von polyreaktiven IgM Antikörpern im Menschen hauptsächlich durch die CD5+ B1 B-Zellen verursacht wird.

1.1.1.3 Aktivierung der Endothelzellen

Nicht-aktivierte, sog. „ruhende“ Endothelzellen der Blutgefäße halten die Barriere zwischen dem intravaskulären Raum und dem Organparenchym aufrecht. Außerdem haben sie die Aufgabe, Thrombose zu verhindern. „Ruhende“ Endothelzellen exprimieren Proteine mit anti-thrombotischen Effekt: Thrombomodulin, anti-Thrombin III, Tissue Faktor Pathway inhibitor (TFPI) und das Ektoenzym ADPase, welches durch effiziente Degradation der von Blutplättchen gebildeten ADP die Amplifikationswege zur Pfropfenbildung verhindert (Abb. 3). Auf den Endothelzellen findet man normalerweise auch das saure Polysaccharid Heparansulfat, das die Superoxiddismutase bindet, ein zur Degradation reaktiver Sauerstoffderivate benötigtes Enzym.

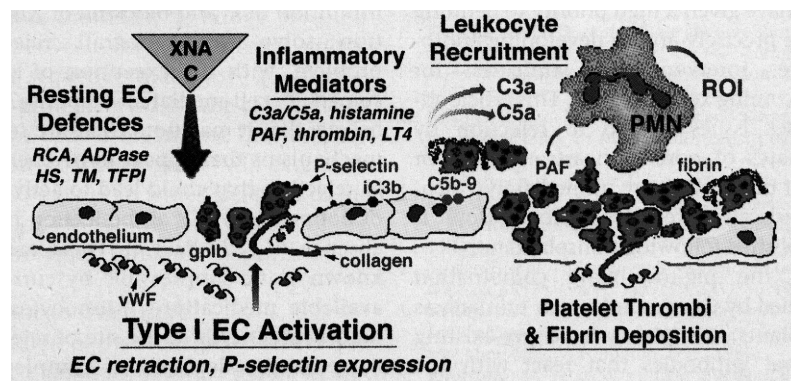


Abb. 3. Schematische Darstellung der Typ 1 Endothelzell-Aktivierung und hyperakuten Abstoßung (HAR).
Quelle: Bach *et al.*, 1995.

Durch bindende XNA und in der Folge nach Ablauf des klassischen Komplementaktivierungsweges aber auch durch Aktivierung des alternativen Komplementweges wird am Endothel der terminale Komplementkomplex MAC gebildet, welcher die Lyse und auch die Aktivierung der betroffenen Zellen herbeiführt. Durch Komplementaktivierung freigesetztes Anaphylatoxin C5a bewirkt unter anderem die Freisetzung von Zell-assoziierten Proteasen des Endothels (Ihrcke und Platt, 1996) und dadurch die Abspaltung des sauren Polysaccharids Heparansulfat von der Oberfläche (Platt *et al.*, 1990b), das an der Barrierefunktion des Endothels gegen Blutzellen, Plasmaproteine, an der Antikoagulation und am Schutz gegen Komplement und oxidierende Stoffe beteiligt ist (Platt, 1992; Ihrcke *et al.*, 1993). Daneben bewirkt C5a eine Aktivierung der Xanthin-Oxidase, ein Sauerstoffradikale produzierendes Enzym, und trägt somit zur weiteren Endothelzellschädigung bei (Friedl *et al.*, 1989). Bei der Aktivierung der Endothelzellen sind aber auch weitere Mediatoren wie Thrombin, Histamin, Leukotriene und Eicosanoide beteiligt (Mantovani *et al.*, 1992).

Die Aktivierung der Endothelzellen während der HAR - man spricht hier von Typ I der Endothelzellaktivierung, für die noch keine Proteinsynthese erforderlich ist, - führt zu einer Retrahlung der Zellen, es kommt zu Blutung und Ödembildung, und subendotheliale Moleküle, wie der von Willebrand Faktor werden freigesetzt (Abb. 3). Blutplättchen können sich an die subendotheliale Matrix anheften und exprimieren wie die aktivierten Endothelzellen verstärkt P-Selektin. Es kommt zur Sekretion von inflammatorischen Mediatoren, wie PAF (platelet activating factor), Thrombin und Leukotrienen. Dies bedingt eine weitere Rekrutierung von Plättchen und Ver-

stärkung der Koagulation. In der Konsequenz lagert sich Fibrin an der Oberfläche der aktivierten Endothelzellen ab, es kommt zur Thrombose und zum Verlust des Transplantats.

1.1.2 Überwindung der HAR

Zur Überwindung der HAR nach Xenotransplantation in der diskordanten Spezieskombination können verschiedene Ansätze wie Inhibition des Komplementsystems und/oder Reduktion bzw. Depletion der XNA gewählt werden.

1.1.2.1 Inhibition des Komplementsystems

Komplementregulierende Proteine schützen die eigenen Zellen vor einer Schädigung durch aktivierte Komplementkomponenten, die in geringem Umfang ständig im Plasma aktiviert werden. Zu diesen Regulatoren gehören u.a. die membranständigen Glykoproteine DAF (**D**ecay **A**ccelerating **F**actor, CD55), MCP (**M**embrane **C**ofactor **P**rotein, CD46) und CD59. DAF verdrängt C2b aus dem Komplex C4b—C2b, der die C3/C5-Konvertase des klassischen Weges darstellt. MCP unterstützt die C3b- und C3b-Inaktivierung durch den Faktor I, so dass ebenfalls die C3/C5 Konvertase gestört wird. CD59 reguliert die Aktivität der terminalen Komplementkomponenten und verhindert die Bildung des MAC auf homologen Zellen. Diese Proteine zeigen allerdings nur sehr eingeschränkte Kontrolleigenschaften auf heterologe Komplementkomponenten (Atkinson *et al.*, 1991) und daher sind Xenotransplantate wohl für eine Komplementvermittelte Beschädigung empfänglich (Miyagawa *et al.*, 1988; Platt *et al.*, 1990c; Dalmaso *et al.*, 1991). Ein Ansatz zur Verhinderung einer HAR durch Komplementaktivierung ist also die Expression der Komplementregulatoren des Empfängers auf dem Transplantat. Gerade bei der Spezieskombination Schwein/Mensch werden enorme Anstrengungen unternommen, transgene Schweine zu züchten, die humane Komplementregulatorproteine exprimieren (Platt *et al.*, 1990c; Logan und Sharma, 1999; Wolf *et al.*, 1999). Mittlerweile haben mehrere Arbeitsgruppen verschiedene humane Komplementregulatoren in transgenen Schweinen exprimieren können (Cary *et al.*, 1993; Cozzi *et al.*, 1995; McCurry *et al.*, 1995). Verschiedene Experimente mit Primatenarten als Empfänger solch genetisch veränderter Organe haben bereits ein verlängertes Transplantatüberleben von maximal 60 Tagen gezeigt (McCurry *et al.*, 1995; Schmoeckel *et al.*, 1997; Schmoeckel *et al.*, 1998, White, 1996). Die alleinige Expression von humanem DAF in transgenen Schweinen führte auch ohne weitere immunsuppressive Behandlung zu einer Verlängerung der auf Primaten transplantierten Organe (White, 1996; Waterworth *et al.*, 1997). Auch die Expression von humanem CD59 oder MCP alleine oder in Kombination mit DAF erhöhte das Überleben des Xenotransplantates (McCurry *et al.*, 1995, Zaidi *et al.*, 1998; Logan und

Sharma, 1999). Für eine deutliche Erhöhung der Überlebenszeit musste allerdings meist ein starkes immunsuppressives Regime eingesetzt werden.

Die allgemeine Schlussfolgerung, dass transgene Schweine, die humane Komplementregulatoren exprimieren, eine HAR aufgrund der speziesspezifischen Komplementregulation überwinden können, ist nicht unumstritten. Inzwischen wurden porcine Moleküle identifiziert, die als Homologe zu humanem CD59 und MCP die Wirkung von sowohl humanem als auch porcinem Komplement *in vitro* inhibieren können (van den Berg und Morgan, 1994; van den Berg *et al.*, 1997; Hanna *et al.*, 1998; Perez de la Lastra *et al.*, 1999). Zudem wurde beobachtet, dass sich bei Nierentransplantation in der Kombination Schwein/Primat zum Teil keine HAR ereignet (McCurry *et al.*, 1995; Lambrigts *et al.*, 1998).

Zur Vermeidung der Komplementaktivierung und damit einer HAR bei der Xenontransplantation werden neben den membranständigen Komplementregulatoren auch eine lösliche Form des Komplementrezeptor 1 (sCR1) eingesetzt. Dieses Molekül bindet zum einen an C3b und C4b, wodurch die Wirkung der C3 Konvertasen C3bBb3b und C4b2a3b inhibiert wird. Zum anderen ist der sCR1 Kofaktor von Faktor I und katalysiert die proteolytische Spaltung von C3b und C4b. Der sCR1 stellt also einen potenten Inhibitor sowohl des klassischen als auch des alternativen Weges dar. Es wird sowohl die Bildung der Anaphylatoxine C3a und C5a als auch die Bildung von MAC verhindert. Der rekombinante humane Komplementinhibitor sCR1 wurde bereits erfolgreich im Modell MS/Ratte eingesetzt und führte zu einer deutlichen Verlängerung der Überlebenszeit eines diskordanten Herztransplantates von wenigen Minuten bis auf 30 Stunden (Pruitt *et al.*, 1991; Xia *et al.*, 1992; Candinas *et al.*, 1996e). Allerdings ist der humane Inhibitor in Ratten weniger potent und muss daher in relativ hohen Dosen verabreicht werden.

Um das Komplementsystem bei der Xenontransplantation von MS auf Ratte zu inhibieren, findet Cobra Venom Faktor (CVF) häufig Anwendung. Die antikomplementäre Wirkung von CVF, ein Bestandteil des Schlangengiftes der Königskobra *Naja naja kouthia*, wurde bereits 1903 von Flexner und Noguchi beschrieben (Flexner und Noguchi, 1903). Ritz (1912) zeigte den inaktivierenden Effekt auf die 3. Komponente des Komplementsystems. Das etwa 140 kD schwere Glykoprotein CVF ahmt funktionell C3b, die aktivierte Form der 3. Komplementkomponente nach (Vogel *et al.*, 1984). Dadurch entstehen sogenannte CVF-abhängige C3/C5 Konvertasen, die als Serinproteasen die α -Kette von C3 an der Peptidbindung 77 (Arg-Ser) und die α -Kette von C5 an der Peptidbindung 74 (Arg-Leu) spalten, so dass C3b und C5b gebildet und die Anaphylatoxine C3a und C5a freigesetzt werden. Gravierende Unterschiede der CVF abhängigen Konvertase zu dem C3b abhängigen Enzym sind der wesentlich langsamere Abbau (Vogel und Müller-Eberhard, 1982), die Resistenz gegenüber der Inaktivierung durch die Regulatorproteine Faktor H und Faktor I (Lachmann und Halbwachs, 1975; Nagaki *et al.*, 1978) und die Unabhängigkeit von C3b für die C5-Spaltung (Miyama *et al.*, 1975; von Zabern *et al.*, 1980). Der

Einsatz von CVF zur Komplementdepletion bei Xenontransplantation hat allerdings auch einige Nachteile. Zum einen muss CVF ausreichend hoch dosiert werden, denn auch sehr kleine funktionelle Komplement-Konzentrationen sind ausreichend, um eine HAR zu induzieren (Ihrcke *et al.*, 1993). Zudem wirkt CVF als Schlangengift hochtoxisch, wenn unaufgereinigte CVF Präparationen eingesetzt werden (Schirmer *et al.*, 1988). So führt die in CVF enthaltene Phospholipase A₂ zu einer Lyse von Erythrozyten (Lachmann *et al.*, 1976), daher muss die Substanz vor Gebrauch aufgereinigt werden. Der systemische Verbrauch von Komplement induziert die Bildung potenter Anaphylatoxine wie C3a und C5a, die ihrerseits Veränderungen in empfänglichen Organen wie der Lunge hervorrufen können (Ward *et al.*, 1985) oder auch an den morphologischen Veränderungen des Transplantats durch Erhöhung der Zellinfiltrate beteiligt sein können (Candinas *et al.*, 1996e). Ein weiterer Nachteil von CVF ist, dass er als starkes Immunogen gilt und somit eine starke humorale Antwort hervorrufen kann, die im Gegenzug die Effektivität der Komplementdepletion reduziert (Candinas *et al.*, 1996e). Außerdem scheint CVF mit der Aktivierung der Koagulation und der Blutplättchen zu interferieren (Hutton und Warell, 1991; Sims und Wiedmer, 1991).

Eine weitere Möglichkeit zur Vermeidung der HAR durch Aktivierung des Komplementsystems ist die Verwendung einer komplementdefizienten Empfängerspezies. Im MS/Ratte Modell kann der C6-defiziente Rattenstamm PVG/C6- als Empfänger eingesetzt werden. Dieser Rattenstamm mit autosomal rezessivem Erbgang, dem die Fähigkeit zur Aktivierung des C5b-9 MAC Komplexes fehlt, wurde 1994 beschrieben (Leenaerts *et al.*, 1994). Es gibt keinen Hinweis für eine Deletion innerhalb des C6 Gens, denn die für C6 kodierende mRNA wurde bei PVG/C6-Ratten in der gleichen Größe wie bei den PVG/C6+Ratten in der Leber nachgewiesen, wenn auch in etwa 100mal niedrigeren Konzentrationen (van Dixhorn *et al.*, 1997). Die C6 Defizienz beruht möglicherweise auf einer instabilen mRNA, einer Punktmutation im C6 Gen und damit einer aberranten Transkription oder auf einer Mutation in einem Gen, das für ein in die C6-Biosynthese involviertes Produkt kodiert. Die PVG/C6- Ratten zeigen trotz C6-Defizienz und nur 10% C2 gegenüber Komplement-kompetenten Tieren (PVG/C6+) keine Krankheitsanzeichen. Werden die PVG Ratten mit Defekt in der terminalen Endstrecke des Komplementsystems als Empfänger eines heterotop transplantierten MS Herzens eingesetzt, so verlängert sich das Transplantatüberleben von 26 Minuten (komplementkompetenter PVG-Stamm) auf 24 bis 48 Stunden (Brauer *et al.*, 1993).

1.1.2.2 Reduktion /Depletion der XNA

Um XNA bzw. deren Aktivität zu reduzieren, werden verschiedene Methoden angewendet. Im System Schwein/Primat versuchte man aufgrund der guten Kenntnisse der von XNA erkannten Epitope durch Gabe von löslichen Sacchariden, die Bindung Antikörper-Antigen zu blockieren (Ye *et al.*, 1994). Allerdings war man damit nicht sehr erfolgreich, da die einzusetzende Menge

an Zucker toxisch war und nur etwa 70% der XNA geblockt werden konnten. Als Alternative wurde die Plasmapherese oder die passive Immunabsorption an Gal α 1-3 Gal Zucker tragende Säulen eingesetzt (Neethling *et al.*, 1994; Sablinski *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 1996; Lin SS *et al.*, 1997). Eine weitere Möglichkeit ist die Züchtung von Schweinen, die die Zuckerepitope Gal α 1-3Gal nur in geringem Maße exprimieren (Sharma *et al.*, 1996; Sandrin *et al.*, 1995; Osman *et al.*, 1997).

Desweiteren können verschiedene Immunsuppressiva zur Reduktion der XNA eingesetzt werden. Verwendung finden Cyclophosphamid (Waterworth *et al.*, 1997), FK 506 (Tacrolimus), 15-Desoxyspergualin (DSG) und Leflunomid.

Um in Ratten anti-MS Antikörper zu reduzieren oder zu depletieren, wurden verschiedene B-Zell-supprimierende Medikamente eingesetzt. Der Einsatz eines monoklonalen anti- μ Antikörpers mit totaler Reduktion der IgM XNA verlängerte das Überleben eines heterotop auf Ratte transplantierten MS-Herzens von 18 auf 62 Minuten (Soares *et al.*, 1994). Eine Ganzkörperbestrahlung mit anschließender syngener Knochenmarkstransplantation kombiniert mit Splenektomie reduzierte die XNA in Ratten praktisch völlig, führte aber im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu keiner Steigerung des Transplantatüberlebens (19 Minuten). Erst in Kombination mit Depletion des Komplementsystems durch CVF wurde ein deutlich verlängertes Transplantatüberleben von 6 Tagen erzielt (Scheringa *et al.*, 1995b). Im MS/Ratte Modell kam auch DSG zum Einsatz. DSG blockiert die terminale Differenzierung von T- und B-Zellen (Chikaraishi *et al.*, 1995) und reduziert die XNA Produktion (Flores *et al.*, 1992). Zusammen mit Splenektomie und Plasmapherese erhöhte DSG das Überleben eines in die Ratte transplantierten MS Herzens nur geringfügig von 20 Minuten auf 35 Minuten (Leventhal *et al.*, 1992a). Wiederum in Kombination mit der Komplementinhibition durch CVF ergab die Applikation von DSG in splenektomierten Ratten ein erhöhtes Transplantatüberleben eines MS Herzens von 108 Stunden (Hancock *et al.*, 1997a).

Ein weiteres B-Zellsuppressivum, das für Ratten verwendet wird, ist Leflunomid oder eines seiner Metabolitenderivate Malonitrylamid (MNA). Die immunsuppressive Wirkung des Isoxazol-Derivates Leflunomid (N-(4'-trifluoromethylphenyl)-5-methylisoxazol-4-carboxamid) wurde in den frühen 80er Jahren von Bartlett und Schleyerbach durch die Fähigkeit die Entwicklung von Arthritis in Ratten zu inhibieren, entdeckt (Bartlett *et al.*, 1994) *In vivo* wird Leflunomid schnell in den aktiven Metaboliten A77 1726 konvertiert. Die 2 biochemischen Aktivitäten, die A77 1726 zugeschrieben werden, sind: Inhibition der Protein-Tyrosin-Kinasen und der Dihydroorotat-Dehydrogenase, die als Schlüsselenzym bei der *de novo* Synthese von Pyrimidin Nukleotiden beteiligt ist (Cherwinski *et al.*, 1995; Greene *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996). Pyrimidin Nukleotide wiederum werden für einige lebensnotwendige Zellfunktionen benötigt, wie Synthese von RNA, DNA, Glykoproteine und Phospholipide. Die Behandlung mit Leflunomid führt unter anderem

zur direkten Inhibition der B-Zell-Proliferation und Antikörper-Synthese (Siemasko *et al.*, 1996). Daneben inhibiert Leflunomid auch vielfältige Funktionen von T-Zellen und Makrophagen (Morris, 1995). Leflunomid wurde erfolgreich in der Allotransplantation (Bartlett *et al.*, 1991) und auch in der Xenotransplantation zur Verlängerung des Transplantatüberlebens eingesetzt. Neben Hemmung der T-Zell-unabhängigen Bildung von XNA des IgM-Isotyps durch Reduktion der CD5+ B-Lymphozyten (Lin *et al.*, 1998a) blockiert Leflunomid zudem die Induktion solcher Antikörper durch Inhibition der Expression induzierbarer Xenoantigene wie E- und P-Selektin (Lin *et al.*, 1998b). In Kombination mit dem Komplementinhibitor CVF wurde durch Leflunomid eine Erhöhung eines heterotop in Ratte transplantierten MS Herzens auf 129 Stunden erzielt, wohingegen die alleinige Gabe von CVF ein Überleben von 62 Stunden bewirkte (Hancock *et al.*, 1997a).

1.1.3 Verzögerte Abstoßung eines Xenotransplantats (DXR)

In einer Situation, in der die HAR eines Xenotransplantates durch therapeutische Maßnahmen, wie z.B. Modulation der Komplementaktivierung und/oder Entfernung der XNA verhindert wird, kommt es nach einigen Tagen zu einer T-Zell-unabhängigen Abstoßung (Candinas *et al.*, 1996a). Dieser Prozess wird als akute vaskuläre Abstoßung (AVR; **A**cute **V**ascular **R**ejection) oder als verzögerte Xenotransplantatabstoßung (DXR: **D**elayed **X**enograft **R**ejection) bezeichnet und ist durch eine Serie von Ereignissen charakterisiert, welche sowohl die Aktivierung mononukleärer Zellen des Empfängers (fortschreitende Infiltration des Transplantates mit Monozyten, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen), Blutplättchen-Aggregation und Fibrinablagerungen als auch die Aktivierung von Endothelzellen des Transplantates umfasst (Bach *et al.*, 1996; Hancock, 1997b). Pathologisch ist der Prozess durch Endothelzellschädigung und Schwellung, Ischämie und Thrombose gekennzeichnet. Die funktionelle Bedeutung und die molekularen Mechanismen der DXR sind zur Zeit noch Gegenstand einer intensiven Diskussion und bedürfen weiterer Experimente zur Klärung der offenen Fragen. Eine Reihe wesentlicher Erkenntnisse wurden jedoch aus *in vivo* Versuchen in konkordanten und diskordanten Kleintiermodellen (Hamster bzw. MS/Ratte) und bei Primaten (Schwein/Pavian) erzielt.

1.1.3.1 Endothelzellaktivierung bei der DXR

Die bereits bei der HAR besprochenen Mediatoren wie XNA, Komplement und Endothelzellaktivierung, spielen wohl auch bei der DXR eine wesentliche Rolle (Bach *et al.*, 1995; Candinas *et al.*, 1996a; Bach *et al.*, 1997b; Lin *et al.*, 1998c). Die Rolle des Komplementsystems bei der Pathogenese der DXR ist noch nicht vollständig verstanden, denn die DXR wurde bisher nur in Komplement-inhibierten Empfängern beobachtet. Histologische Untersuchungen der durch DXR abgestoßenen Transplantate zeigen neben Ablagerungen von XNA auch Komplementab-

lagerungen. Eine bereits geringfügige Aktivierung des Komplementsystems kann über den MAC auf dem Endothel zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivierung von IL1 führen sowie zur Aktivierung der Gerinnung durch Expression des Tissue Factors und des Plasminogen Aktivator Inhibitors Typ I und somit zur DXR mit beitragen (Saadi und Platt, 1999).

Während der DXR werden Endothelzellen aktiviert (Abb. 4), man spricht hierbei vom Typ II der Endothelzellaktivierung, da sie mit der Induktion der Transkription von Genen und Synthese von Proteinen einhergeht (Pober und Cotran, 1991). Unter anderem werden die Gene der Adhensionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 induziert, wodurch der Kontakt zwischen Leukozyten und Endothel vermittelt wird (Scarpati und Sadler, 1989). Proinflammatorische Gene werden über NF- κ B hochreguliert und in der Folge Zytokine und Chemokine, wie IL1, IL6, IL8 und Monozyten Chemoattraktant Protein (MCP-1), freigesetzt (Soares *et al.*, 1998). Desweiteren werden, wie oben bereits erwähnt, die Gene für den Gewebefaktor (TI: **T**issue **F**actor) und PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor –1) hochreguliert, die als Regulatoren der Gerinnungsaktivierung eine wichtige Rolle spielen (Mackman *et al.*, 1990; Mackman *et al.*, 1991). Thrombomodulin und andere Moleküle mit antikoagulatorischer Aufgabe oder mit der Entfernung von giftigen Sauerstoffradikalen betraute Moleküle gehen der Endothelzelloberfläche verloren (Gerritson und Bloor, 1993; Bach *et al.*, 1997a).

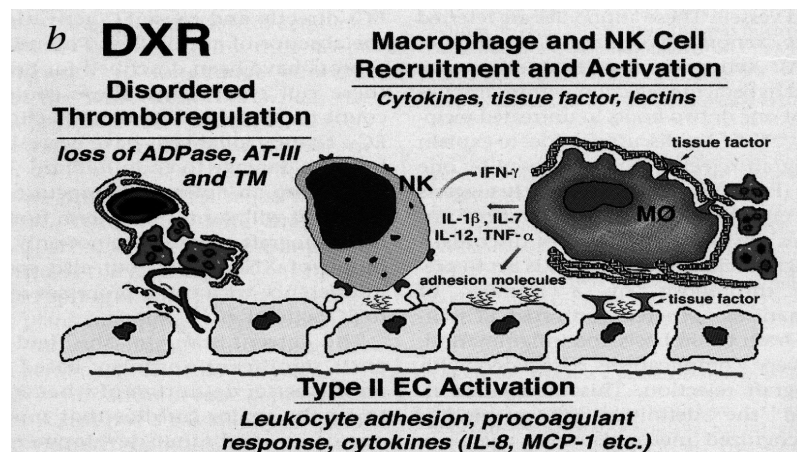


Abb. 4. Schematische Darstellung der Typ 2 Endothelzell-Aktivierung und der verzögerten Abstoßung (DXR).

Quelle: Bach *et al.*, 1995.

1.1.3.2 Monozyten in der DXR

Monozyten sind im Blut vorhandene Vorläuferzellen, die sich nach Einwanderung in das Gewebe in Makrophagen, große einkernige, phagozytierende Zellen umwandeln, die der unspezifischen Immunabwehr dienen. Die Makrophagen tragen, wie Natürliche Killerzellen, auf ihrer Zelloberfläche zum einen Rezeptoren für den Fc-Teil von Immunglobulinen, durch deren Bindung die Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC: Antibody Dependant Cell mediated Cytotoxicity) der durch Immunglobulin markierte Zelle vermittelt wird. Daneben finden sich auf der Oberfläche des Makrophagen auch Komplementrezeptoren für C3b und C4b, deren Bindung zur Stimulation der Phagozytose führt. Und nicht zuletzt besitzen Makrophagen auch noch Rezeptoren für verschiedene Bestandteile von Mikroorganismen, wie Mannoserezeptor, Scavenger Rezeptor und Rezeptoren für Lipopolysaccharide. Der aktivierte Makrophage nimmt nach Bindung Zellen in ein Phagosom auf, das dann mit Lysosomen verschmilzt. In den Lysosomen sind Substanzen enthalten, die zur Schädigung der „Fremdzellen“ durch Ansäuerung, toxische Sauerstoffderivate und Stickstoffderivate aber auch durch antimikrobielle Peptide oder Enzyme führen. Fremdpeptide werden auf den MHC II Molekülen des Makrophagen präsentiert und bei gleichzeitiger Expression von Kostimulatoren, wie B7, kommt es zur Proliferation und Differenzierung von T-Zellen. Daneben setzen aktivierte Makrophagen auch proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IL12 frei (Westerfelder *et al.*, 1993).

Bei der Xenotransplantation können mononukleäre Zellen des Empfängers über Interaktion ihrer Fc-Rezeptoren mit endothelständigen XNA sowie über induzierte Adhensionsmoleküle oder Lektin-abhängige Interaktionen mit dem Transplantatendothel in Kontakt treten. Im MS/Ratte Modell der DXR zeigte die dauerhafte Reduktion von XNA keinen Effekt auf die Rate oder das Ausmaß der Monozyteninfiltration oder die Überlebenszeit (Candinas *et al.*, 1996c; Hancock *et al.*, 1997a). In diesem Xenotransplantationsmodell scheint für die Rekrutierung der Monozyten die Expression von Lektin auf der Makrophagenoberfläche für die Bindung an Kohlenhydrat-Strukturen auf den Endothelzellen des Empfängers verantwortlich zu sein (Hancock *et al.*, 1997a). Dieses Lektin ist Makrophagen-spezifisch und gehört wie der Rezeptor NKR-P1 von Natürlichen Killerzellen zu den TYPII Transmembranproteinen. Nur aktivierte Makrophagen exprimieren dieses Lektin, das die direkte Bindung und Abtötung verschiedener Zielzellen verursacht (Sato *et al.*, 1992). Daher ist die Lektininduktion nach Exposition gegen xenogene Zellen ein potentielles Mittel zur schnellen Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen des Spenders. Die Rekrutierung und Aktivierung mononukleärer Zellen kann auch durch thrombininduziertes Fibrin und durch chemotaktische Zytokine gefördert werden (Colotta *et al.*, 1994).

1.1.3.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bei der DXR

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören morphologisch zu den großen granulären Lymphozyten und sind funktionell durch die Fähigkeit, verschiedene zelluläre Ziele einschließlich Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen zu töten, charakterisiert (Trinchieri, 1989). Beim Menschen sind etwa 5 bis 15% der zirkulierenden Lymphozyten NK-Zellen und repräsentieren nur eine Minderheit der gesamten NK-Zellen. In Nagetieren sind die NK-Zellen zahlreicher in der Milz (10%) als in der peripheren Zirkulation zu finden. Daneben sind sie aber auch in einigen nichtlymphoiden Organen, z. B. Lunge oder Intestinalmukosa zu finden. In manchen Organen, z. B. der Leber repräsentieren NK-Zellen bis zu 45% der gewebsassoziierten Lymphozyten. Auf der Zelloberfläche der NK-Zellen werden sowohl aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren, wie die Lektin-ähnlichen Rezeptoren NKR-P1 und Ly-49, exprimiert. Sie tragen durch Bindung an Kohlenhydrate (NKR-P1 und andere) oder der MHC Klasse I Moleküle (z. B. Ly-49) zur Erkennung und Lyse der Zielzellen beitragen. Zum anderen tragen humane NK-Zellen auf ihrer Oberfläche auch Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR: **K**iller cell **I**mmunglobulin-like **R**eceptor). Die KIR binden an autologe MHC Klasse I Moleküle und diese Verbindung induziert u.a. ein negatives Signal auf die NK-Zelle, was zum Abbruch der Lyse führt, oder ein positives Signal, welches eine Aktivierung der NK-Zelle und in der Folge die Lyse der Zielzelle induziert. Auf der Zelloberfläche der NK-Zellen befinden sich auch Fc-Rezeptoren (Fc γ RIII), die nach Bindung an Immunglobuline zur ADCC, Proliferation und Zytokinproduktion beitragen.

Die NK-Zelle lysiert das Ziel, wie Tumorzellen oder mit Viren infizierte Zellen, durch Stimulierung der aktivierenden Rezeptoren oder der Fc-Rezeptoren. Syngene Zellen exprimieren auf der Zelloberfläche autologe MHC I Moleküle. Dadurch werden u. a. die inhibierenden Rezeptoren der NK-Zelle stimuliert, wodurch die Lyse der körpereigenen Zellen verhindert wird. Bei der Allotransplantation kann eine mehr oder minder starke Aktivierung der NK-Zellen erfolgen in Abhängigkeit des Ausmaßes an Kreuzreaktivität zwischen allogenen MHC I und den NK-Zell-Rezeptoren des Empfängers. Bei Xenotransplantation hingegen scheint eine Lyse aufgrund der unterschiedlichen MHC I Moleküle des Spenders und der nicht passenden NK-Zell-Rezeptoren des Empfängers primär unumgänglich.

Die Mechanismen der Zielzell-Tötung durch NK-Zellen sind zum einen eine Fas/Fas-Ligand Interaktion, d.h. nach Bindung des Fas-Liganden auf der Effektorzelle mit seinem Rezeptor Fas/apo-1/CD95 auf der Zielzelle kommt es zur Signaltransduktion (Rouvier *et al.*, 1993; Yonehara *et al.*, 1989). Zum anderen wird die Tötung der Zielzelle durch die granuläre Exozytose bewirkt, d.h. die Zielzelle wird den Inhalten der Lysosom-ähnlichen zytoplasmatischen Granula ausgesetzt (Henkart, 1985; Smyth und Trapani, 1995; Kagi *et al.*, 1994). Beim granulären Exozytose Weg kommt es zur Sekretion der Granula in die Kontaktregion zwischen Effektor- (NK-Zelle) und Zielzelle. Diese zytoplasmatischen Granula enthalten Perforin, das, ähnlich wie der MAC, in der Membran der Zielzelle Poren bildet und daher zur osmotischen Lyse beiträgt (Liu *et al.*, 1986), aber auch Granzyme, Serinproteasen, die bei der Induktion der Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung in der Zielzelle involviert sind und damit zu deren Apoptose beitragen (Smyth und Trapani, 1995).

Nach HAR wurden NK-Zellen in den abgestoßenen Transplantaten bisher nur in geringer Anzahl beobachtet (Leventhal *et al.*, 1993a; Leventhal *et al.*, 1993b; Collins *et al.*, 1994), wohingegen sie in großer Anzahl nach DXR vorhanden waren (Blakely *et al.*, 1994). Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers (mAb) 3.2.3, der das NKR-P1-Antigen auf NK-Zellen erkennt, wurde nachgewiesen, dass Ratten NK-Zellen während DXR MS Transplantate infiltrieren (Hofer *et al.*, 1992). Allerdings wurden bei der DXR immer gleichzeitig NK-Infiltration und Ablagerungen von XNA auch bei vorheriger Depletion der xenoreaktiven Antikörper im Transplantat festgestellt, so dass die Zytotoxizität der NK-Zellen entweder durch direkte Mechanismen und/oder ADCC bedingt sein könnte (Leventhal *et al.*, 1993a; Fryer *et al.*, 1995). Es wurde sowohl eine direkte als auch eine antikörperabhängige NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität beschrieben, die in der Lyse der Endothelzellen resultiert (Inverardi und Pardi, 1994; Seebach *et al.*, 1996). In der Kombination Schwein/Primat wurde neben der Bindung der NK-Zellen über den Fc-Rezeptor an endothelständige XNA, wie bei Makrophagen, auch eine direkte Bindung an die Endothelzellen gefunden, wobei diese Bindung teilweise mit der Erkennung von Gal α 1-3Gal Epitopen zusammenhängt und auch in der Abwesenheit von XNA erfolgen kann (Goodman *et al.*, 1996; Invera-

di *et al.*, 1997). Lin Y *et al.* (1997a) konnten auch in der konkordanten Kombination Hamster/Nacktratte bestätigen, dass die NK-Zellen zusätzlich zur ADCC eine Abstoßung auch durch direkte Zytotoxizität verursachen. Der direkte Zellkontakt zwischen NK-Zellen und xenogenen Endothelzellen löst in einem zeitabhängigen Verlauf eine Endothelzellaktivierung aus (von Albertini *et al.*, 1996).

Durch Verwendung NK-Zell-defizienter Empfänger bei Xenotransplantation wurde in der konkordanten Situation eine Verlängerung des Transplantatüberlebens festgestellt (Thomas *et al.*, 1991). NK-Zellen können aber auch gezielt depletiert werden. Auf der NK-Zelloberfläche findet man in hoher Konzentration ein neutrales Glykolipid, das Ganglio-N-tetraosylceramid (ASGM1) (Young *et al.*, 1980; Kasai *et al.*, 1980), das in geringerer Konzentration auch auf anderen Zellen, wie Monozyten, polymorphkernigen Leukozyten und T-Zellen exprimiert wird (Kumagai *et al.*, 1982). Ein gegen dieses Antigen gerichtetes Antiserum (Anti-ASGM1) eliminiert die NK-Zell-Aktivität selektiv *in vitro* (Kumagai *et al.*, 1982; Beck *et al.*, 1982) und *in vivo* (Kasai *et al.*, 1981, Habu *et al.*, 1981). Die Aktivität von Makrophagen (Keller *et al.*, 1983) und die von zytotoxischen T-Zellen (Kasai *et al.*, 1980; Young *et al.*, 1980; Beck *et al.*, 1982; Kawase *et al.*, 1982) hingegen bleibt unbeeinflusst. Allerdings muss zur Wirkung des Antikörpers Komplement vorhanden sein.

1.1.4 Akkomodation

Die DXR ist nicht das einzige mögliche Ergebnis nach Transplantation eines vaskularisierten Organs und dessen Auseinandersetzung mit der humoralen Immunantwort des Empfängers. Unter geeigneten Bedingungen kann Akkomodation entstehen, ein Begriff, der 1990 von Bach eingeführt wurde (Platt *et al.*, 1990c). Unter Akkomodation versteht man den Zustand, bei dem das Transplantat sich scheinbar an die Immunreaktionen gewöhnt hat, die unter anderen Bedingungen zu seiner Zerstörung führen. Das Transplantat kann in der Anwesenheit von XNA und aktiviertem Komplement, welche an das vaskuläre Endothel binden, überleben (Platt *et al.*, 1990c; Bach *et al.*, 1991; Saadi und Platt, 1999). Der Zustand der Akkomodation kann durch einen oder mehreren von 3 Mechanismen entstehen. 1. Möglichkeit: Anti-Spender Antikörper ändern sich in ihren funktionellen Eigenschaften und/oder in ihrer Spezifität. Unterstützung liefern dabei Arbeiten mit ABO inkompatiblen Allotransplantaten (Chopek *et al.*, 1987; Alexandre *et al.*, 1987). Zu dieser Möglichkeit zählt auch eine Veränderung der XNA zu vorherrschenden Antikörpern des IgG2-Isotyps, der Komplement nur geringfügig aktiviert und mit Komplementfixierenden Antikörpern um die Bindung konkurrieren würde (Yu *et al.*, 1996). 2. Möglichkeit: Die Antigene können sich verändern. Dieses Konzept wird durch Beobachtungen gestützt, dass

die Kohlenhydratsynthese in Allotransplantaten sich im Laufe der Zeit ändert (Ulfvin *et al.*, 1993). 3. und wahrscheinlichste Möglichkeit: Durch Akkomodation findet eine Veränderung des Endothels statt, so dass das Transplantat gegenüber Antikörperbindung und Komplementaktivierung unempfindlich wird. Diese Konzept wird durch Studien untermauert, die belegen, dass in einem Nagetiermodell die Akkomodation mit Expression von zytoprotektiven Genen mit anti-apoptotischen Eigenschaften, wie A20, Bcl-2, Bcl-X_L und HO-1, einhergeht (Bach *et al.*, 1997b). Kontinuierliche Stimulation dieser Endothelzellen durch Antikörper und/oder Komplement führte zu einer geringeren Sensitivität gegenüber Schädigungen (Dalmasso *et al.*, 1996). Eine wichtige Voraussetzung zur Induktion von Akkomodation im Transplantat scheint es zu sein, die Aktivierung der Endothelzellen und glatter Muskelzellen im Transplantat nach Transplantation so niedrig wie möglich zu halten, damit die Zellen die zytoprotektiven Gene hochregulieren können. Im akkomodierten Transplantat ist zudem ein typisches Th2-Zytokin-Milieu beobachtet worden mit Expression von IL4 und IL10. Im Gegensatz dazu zeigen abgestoßene Transplantate ein Th1-Zytokin-Milieu (Bach *et al.*, 1997b; Holzknacht und Platt, 2000). Während naive CD4 positive T-Zellen durch IL12 zu Th1 Zellen differenzieren, werden sie unter Einfluss von IL4 zu Th2 Zellen. Th1 Zellen sekretieren IFN γ , das die Differenzierung von Th2 Zellen inhibiert und die zellvermittelte Immunität fördert. Dadurch wird das Transplantat in einer akuten zellulären Abstoßung abgestoßen. Th2 Zellen hingegen sezernieren IL4 und IL10, was die Differenzierung von Th1 Zellen inhibiert und die B-Zell-Antwort (humorale Immunität) fördert. Dies würde dann zur humoralen und nicht zellulären Abstoßung des Transplantats führen. Die lokale Sekretion von Th2-Zytokinen kann an der Hochregulation protektiver Gene in den Endothelzellen beteiligt sein (Hancock *et al.*, 1998; Arthur und Mason, 1986; Randolph *et al.*, 1998). Alternativ können die Th2 Zellen das Entstehen von zytotoxischen, gegen das Transplantat gerichteten Antikörpern sowie die Bildung zytotoxischer T-Zellen und/oder aktivierter NK-Zellen verhindern, wie *in vitro* bereits gezeigt wurde (Bach *et al.*, 1997b).

Bisher ist Akkomodation nur im konkordanten und kürzlich auch im semikonkordanten Hamster/Ratte Modell gezeigt worden (Lin *et al.*, 1998c; Ji *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 2000).

1.1.5 T-Zell vermittelte Abstoßungsreaktionen

Die Erkennung von xenogenen Antigenen und Zellen durch T-Lymphozyten, ein bekanntes Phänomen bei Allotransplantation, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Die Interaktionen der

beteiligten Erkennungsmoleküle auf T-Zellen (T-Zell-Rezeptor, CD4 CD8, Kostimulationsmoleküle) mit den korrespondierenden Molekülen auf den Antigen-präsentierenden Zellen sind hochgradig abhängig von der jeweiligen Spezieskombination und lassen sich nicht verallgemeinern. In der potentiell relevanten Kombination Schwein/Primat jedoch scheint die xenogene T-Zell-Erkennung der allogenen in Stärke und Dynamik mindestens gleichwertig zu sein. Sachs und Sablinski (1995) zeigten sogar, dass die zelluläre Antwort gegen ein Xenotransplantat noch stärker ausfällt als bei Allotransplantation, so dass eine adäquate Immunsuppression nur sehr schwer aufrecht erhalten werden kann.

Aufgrund der limitierten Überlebenszeiten von experimentellen Nieren- und Herztransplantationen von Schwein auf Primat sowie Einsatz einer massiven Immunsuppression ist die Rolle der T-Zell vermittelten Abstoßung *in vivo* nur schwer zu klären. *In vitro* Studien hingegen belegen, dass porcine Antigene sowohl direkt (Antigen-Präsentation durch xenogene MHC-Moleküle auf xenogenen Zellen) als auch indirekt (Antigen-Präsentation durch eigene MHC-Moleküle auf eigenen Antigen-präsentierenden Zellen) von menschliche T-Lymphozyten erkannt werden und zur Proliferation und Zytotoxizität führen (Moses *et al.*, 1990; Yamada *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1996).

1.1.6 Toleranz

Eine erfolgreiche Xenotransplantation im Menschen scheint, eine Induktion einer Spender-spezifischen Toleranz zu erfordern. Ein toleranter Status, bei dem das Immunsystem des Empfängers die Antigene des Spenders als „selbst“ wahrnimmt, würde zudem eine chronische immunsuppressive Therapie mit ihren Nebenwirkungen, wie Infektionsgefahr, Toxizität und Entstehen von malignen Tumoren, abwenden und gleichzeitig die Abstoßungsgefahr eliminieren. Durch den Einsatz von xenogenen Spendern ist die Möglichkeit gegeben, Toleranz-induzierende Zellen (z. B. Knochenmark) vom Spender vor der Transplantation eines Organs von demselben Tier zu gewinnen. Zur Zeit werden die Ansätze zur Erzeugung von B- und T-Zell-Toleranz durch xenogene Thymustransplantation und durch einen Zustand des gemischten Blutstammzellen-Chimerismus nach Knochenmarkstransplantation untersucht (Sykes *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998; Kozłowski *et al.*, 1999).

Im konkordanten Tiermodell Hamster/Ratte konnte durch Infusion mit Donorantigenen, transientser NK-Zell-Depletion und einer 4wöchigen Gabe des B-Zellsuppressivums Leflunomid eine Toleranz mit Langzeitüberleben des Transplantats in T-Zell-defizienten Nacktratten auch nach Absetzen der Immunsuppression beobachtet werden (Lin *et al.*, 1998c). Es wurden keine anti-

Hamster Antikörper generiert (B-Zell-Toleranz) und ein zweites transplantiertes Hamsterherz wurde spezies-spezifisch toleriert, wohingegen ein Mausherz abgestoßen wurde. Diese Studie zeigte zudem eine spezies-spezifische Toleranz der NK-Zellen.

1.1.7 Physiologische Barrieren

Sollte die Xenotransplantation gelingen, ist die Frage nach physiologischer Kompatibilität zu klären. Zum einen ist wichtig, ob das Xenotransplantat die Funktion des geschädigten Organs vollkommen übernehmen kann, z. B. ob ein Schweineherz den normalen Blutdruck und die normale Organdurchblutung im Menschen aufrecht erhalten kann. Wenn Schweine mit einem Gewicht ähnlich wie erwachsene Menschen untersucht werden, zeigen ihre Organe ein vergleichbares Gewicht und Volumen (Groth, 1998). Erste Untersuchungen scheinen die Ähnlichkeit von kardiovaskulären Parametern, wie Blutdruck und Herzausstromvolumen, zwischen Schweinen entsprechender Größe und erwachsenen Menschen zu belegen (Soin *et al.*, 2000). Zum anderen ist aber auch noch die Frage der molekularen Kompatibilität offen (für eine Zusammenfassung s. Schraa *et al.*, 1999). Moleküle, die in einer bestimmten Art interagieren, funktionieren eventuell nicht, wenn ein Teil vom Spender kommt und der andere vom Empfänger. Wie bereits oben erwähnt, zeigen beispielsweise die Komplementregulatoren zwischen den verschiedenen Spezies keine oder nur eine unzureichende Wirkung. Aber auch andere Systeme können nach Xenotransplantation gestört sein. So zeigten Lawson *et al.* (1997), dass porcines Thrombomodulin nicht mit menschlichen Thrombin interagieren kann, so dass es zu einem Defekt bei der Aktivierung des Proteins C und dadurch zu einem prokoagulantem Status kommt.

Um die physiologischen Kompatibilitäten nach Xenotransplantation zu analysieren, bietet die Lebertransplantation einen geeigneten Versuchsansatz. Die Xenotransplantation der Leber unterscheidet sich prinzipiell von der anderer solider Organe, wie Niere oder Herz. Die Leber ist unbestritten das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers. Zudem stellt die Leber den Hauptsyntheseort des Komplementsystems dar, das bei der Abstoßungsreaktion eine ganz entscheidende Rolle spielt. Im Rahmen des Xenotransplantatüberlebens wird also stets auch das Komplementsystem des Spenderorganismus mittransplantiert (Starzl *et al.*, 1993). Weiterhin ist bekannt, dass die Leber eine besondere Resistenz gegen humorale Abstoßungsmechanismen aufweist. Hyperakute oder vaskuläre Abstoßungsepisoden werden nach allogener Lebertransplantation selten oder nie beobachtet (Starzl *et al.*, 1974). Auf der anderen Seite stellt sich gerade bei der Leber die Frage nach der molekularen Kompatibilität der von dem Xenotransplantat gebildeten Stoffwechselprodukte mit den entsprechenden Rezeptoren im Empfängerorganismus.

Zur Xenolebertransplantation wurde das konkordante Hamster/Ratten Modell unter geeigneter Immunsuppression bereits erfolgreich mit einem Langzeitüberleben von 30 Tagen und Konversion des Komplementsystem zum Donor-Typ beschrieben (Celli *et al.*, 1997). In der diskordanten Situation hingegen konnte aufgrund nicht-immunologisch bedingter Überlebensraten von nur wenigen Stunden eine solche Komplementkonversion nicht festgestellt werden (Schraa *et al.*, 1996).

Die aus dem Tiermodell abgeleiteten Ergebnisse hinsichtlich der physiologischen Kompatibilitäten können nicht ohne weiteres auf die relevante Spezieskombination Schwein/Mensch übertragen werden, liefern aber wichtige Hinweise auf die zu beachtenden Komponenten.

1.2 Ziel der Arbeit

Im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 265, Teilprojekt B16, stand im Mittelpunkt dieser Arbeit die Analyse der humoralen und zellulären Mechanismen bei der Xenotransplantatabstoßung. Dazu wurde das diskordante Kleintiermodell Meerschweinchen (MS)/Ratte gewählt, das der Situation Schwein/Mensch am nächsten kommt.

Da die Leber relativ unempfindlich gegenüber humoralen Abstoßungsreaktionen ist (Starzl *et al.*, 1974) und zudem die Fragestellung nach physiologischen Kompatibilitäten ermöglicht, wurde zunächst die orthotope Lebertransplantation (OLT_X) von MS auf Ratte bearbeitet. Während die OLT_X in der konkordanten Spezieskombination Hamster/Ratte bereits erfolgreich durchgeführt war (Murase *et al.*, 1993, Celli *et al.*, 1995), wurde sie im MS/Ratte Modell bisher nur mit geringem Erfolg bearbeitet (Schraa *et al.*, 1996). Hierbei stellte sich vor allem die Frage nach einer adäquaten Operationstechnik. Im Laufe dieser Arbeit sollten daher die bei der Lebertransplantation von MS auf Ratte auftretenden Schwierigkeiten durch Optimierung der für die Transplantation eingesetzten mikrochirurgischen Technik überwunden werden.

Nach der Xenotransplantation in der diskordanten Situation kommt es aufgrund einer Aktivierung des Komplementsystems zur Hyperakuten Abstoßung (HAR). Zur Verhinderung der Komplementaktivierung und damit zur Erzielung eines verlängerten Transplantatüberlebens nach OLT_X sollte Cobra Venom Faktor (CVF) eingesetzt werden. Hierfür musste CVF zunächst aufgereinigt und anschließend seine antikomplementäre Aktivität bestimmt werden.

Um die Komplementaktivierung bei der Transplantatabstoßung detaillierter zu bestimmen als in dem häufig eingesetzten hämolytischen Test, und um außerdem eine sensitivere Analyse der Dekomplementierung, durch z.B. CVF, zu ermöglichen, sind Antikörper gegen die Komplementproteine geeignete Reagenzien. Da die Leber der Hauptsyntheseort der Komplementpro-

teine ist, können zudem diese Antikörper zur Analyse der Entstehung eines Hybrid-Komplementsystems nach erfolgreicher OLTX eingesetzt werden. Die Antikörper wären zudem in der Lage, die Auswirkungen der Aktivierung eines Hybrid-Komplementsystems auf das Transplantat und auf den Empfängerorganismus zu untersuchen. Dadurch können wichtige Hinweise auf die Stoffwechsellistung der transplantierten Leber und letztendlich auf die physiologischen Kompatibilitäten nach Xenotransplantation gewonnen werden. In dieser Arbeit wurden daher die diagnostischen und therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten von rekombinanten Antikörpern gegen die MS Komplementproteine C5 und C5a überprüft. Es wurden die Eignung der Antikörper zur Detektion von C5-Ablagerungen im Gewebe, die Fähigkeit zur Inhibition des MS Komplementsystems und die Möglichkeit einer Konzentrationsbestimmung der Komplementproteine bestimmt.

Da sich im Laufe der Arbeit die orthotope Lebertransplantation von MS auf Ratte als chirurgisch sehr anspruchsvoll erwies, wurde zum weiteren Studium der immunologischen Vorgänge in einem chirurgisch weniger aufwendigen Verfahren die heterotope Transplantation eines MS Herzens auf Ratte durchgeführt (HHTX). Die HHTX ermöglicht die Untersuchung großer Fallzahlen und durch die regelmäßige Palpation des Transplantates eine genaue Festlegung des Zeitpunktes der Abstoßung.

In diesem Modell sollte neben der Rolle des Komplements, der Einfluss von präformierten und induzierten anti-MS Antikörpern in der Ratte (XNA: xenoreaktive natürliche Antikörper) während der Xenotransplantatabstoßung analysiert werden. Zur Bestimmung der XNA musste zunächst ein Nachweisverfahren etabliert werden, bei dem gegen Membranproteine von MS Zellen gerichtete Antikörper aus Rattenserum in einem ELISA detektiert werden. Als Antigenquellen wurden verschiedene primäre MS Zellen sowie eine MS Zelllinie miteinander verglichen.

Während der HHTX von MS auf Ratte wurden verschiedene immunsuppressive Behandlungsschemata eingesetzt, mit dem Ziel die Abstoßungsreaktion zu überwinden und damit das Transplantatüberleben zu verlängern. Zunächst wurde zur Verhinderung einer HAR die Inhibition des Komplementsystems durch Gabe von CVF bzw. durch Einsatz von Komplementdefizienten Ratten als Transplantatempfänger überprüft. Zusätzlich zur Inhibition des Komplementsystems wurden die Auswirkungen einer Suppression der B-Zellen auf das Transplantatüberleben geprüft. Als B-Zellsuppressivum wurde der *de-novo*-Pyrimidin-Synthese-Inhibitor Leflunomid oder eines seiner Derivate verwendet. Die Wirkung der Gabe von Leflunomid sollte durch Bestimmung der XNA-Spiegel im Empfänger mit Hilfe des etablierten ELISA und durch durchflußzytometrische Analyse der zirkulierenden B-Zellen, die diese Antikörper sezernieren, erfolgen. Die Effektivität der B-Zellsuppression wurde an Ratten überprüft, die als Donor-Antigen MS Leberzellen infundiert bekamen. Da in dem infundierten Leberzellgemisch unter anderem Kupfer'sche Sternzellen, Hepatozyten und dendritische Zellen in der Lage sind, Komplementproteine zu produzieren, sollte die Zirkulation oder Absiedelung der Zellen durch eine

RT-PCR analysiert werden. Hierfür wurden Primer konzipiert, die speziesspezifisch ein DNA-Fragment aus Ratten bzw. MS C3 amplifizieren sollten.

Nach Überwindung der HAR unterliegt das Xenotransplantat einer verzögerten Abstoßung, während der es unter anderem zur Infiltration mit Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) kommt. Im konkordanten Hamster/Ratte Modell wurde durch die Kombination B-Zellsuppression, Infusion von Donor-Antigen sowie transienter Depletion der NK-Zellen in T-Zell-defizienten Empfängern ein Transplantat-Überleben von mehr als 60 Tagen erzielt (Lin *et al.*, 1998c). In Anlehnung an dieses Schema soll überprüft werden, ob durch den gezielten Einsatz immunsuppressiver Medikamente wie Leflunomid und Ciclosporin A (T-Zellsuppressivum) kombiniert mit Applikation von Donor-Antigen und transienter NK-Zell-Depletion eine Toleranz gegenüber dem Transplantat auch in der diskordanten Spezieskombination MS/Ratte erzielt werden kann. Zur Analyse der Depletion der NK-Zellen und deren Regenerierung soll der Anteil der NK-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt werden. Ferner sollen die regenerierten NK-Zellen auf ihre Zytotoxizität in einem Chromfreisetzungstest gegen die Tumorzelllinie YAC 1 überprüft werden, wobei zur Überprüfung der Speziesspezifität der NK-Zell-Aktivität als Zielzellen mit Concanavalin A stimulierte Lymphoblasten des MS und der Maus eingesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

BIAcore-Gerät und Zubehör

BIAcore-X	BIAcore
Sensorchip CM5	BIAcore
Amin-Kopplungs-Kit	BIAcore

Bipolar

Bipolar minicutter 80	Hüttinger
-----------------------	-----------

Brutschränke

Modell B5090E	Heraeus
Typ BB 6220	Heraeus
Modell CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus

Dot Blotter

Minifold I SRC96D	Schleicher & Schüll
-------------------	---------------------

Durchflußzytometer

FACScan™	Becton Dickinson
----------	------------------

EDV

BIAevaluation 3.0	BIAcore
CELLQuest 3.3	Becton Dickinson
Microbeta™ Windows Workstation 1450 Version 2.70.004	Wallac
Microsoft Excel 2000	Microsoft®
Microsoft Power Point 2000	Microsoft®
Microsoft Word 2000	Microsoft®
Herolab E.A.S.Y. Enhanced Analysis Sytem	Herolab
Reference Manager 8.01	Research Information System
Sigma Plot für Windows 3.3	Jandel Cooperation
Sigma Stat für Windows 2.0	Jandel Cooperation
Windows 32 Edit Seq 4.0	DNASTAR
WinMDI 2.8	Scripps Research Institute

Elektrophoresekammer

Gelkammer für horizontale Agarosegele	Forschungswerkstätten MHH
Agagel Midi-Wide	Biometra
Minigel Twin für SDS-Page	Biometra

Elektroporationsgerät

Gene Controler	BioRad
Gene Pulser	BioRad

ELISA Reader

Titertek Multiscan [®] RMCC 1340	Flow Laboratories
---	-------------------

Filtrations- und Konzentrationssystem

Pro Vario-3	Filtron
OMEGA Minisette 0,16 µm	Filtron
OMEGA Minisette 10 kD	Filtron

Folienschweißgerät

Heat sealer LKB 1295-012	Wallac
--------------------------	--------

FPLC-Anlage und Chromatographiesäulen

Liquid chromatography controller LCC-500	Pharmacia
Pump P-500	Pharmacia
Single path monitor UV-1	Pharmacia
Motor valve MV-7 und MV-8	Pharmacia
Mixer 24V	Pharmacia
Fraction collector FRAC-100	Pharmacia
HiLoad 26/60 Superdex 200 prepgrade Säule	Pharmacia
HiTrap [®] Chelating Säule, 5 ml	Pharmacia
Mono Q [®] HR 10/10 Säule	Pharmacia
Protein G-Sepharose Säule, 1ml	Pharmacia

Geltrockner

Modell 583	BioRad
Modell SGD 4050	Savant
Modell Bromma 2003	LKB

Glucometer

Elite	Bayer Diagnostics
-------	-------------------

Konduktometer

CG 852	Schott
--------	--------

pH-Meter

761 Calimatic, digital	Knick
------------------------	-------

Photometer

Ultrospec III Pharmacia

Quarzküvetten

Typ 105202-QS, Schichtdicke 1 cm, 60 µl Hellma

Spannungsgeräte

Biochrom 2103 LKB

Phero-Stab 200 Biotech-Fischer

Schüttler

Plattenshaker MTS 2 IKA

Roto-Rack® Fisher

Schüttelinkubator, Modell G25 New Brunswick

Wipptisch WT12 Biometra

Szintillationsmeßgerät

Trilux 1450 Microbeta™, Liquid scintillator &
Luminescence counter Wallac

Thermocycler

Varius, Modell TCV 5*9 Landgraf

Westernblotkammer

Fast-Blot B33, semidry, kühlbar Biometra

Video-Dokumentations- und Auswertungssystem

Kamera E.A.S.Y. 429 K Herolab

Video-Copy-Processor p68E Mitsubishi

UV-Leuchttisch, Chroma 43, 302 nm Vetter Laborgeräte

Zellerntegerät

Cell Harvester Typ ICH 280 Inotech

Zentrifugen

Kühlzentrifuge, Modell J2-21 Beckmann

Optima™TLX Ultrazentrifuge Beckmann

Minifuge RF Heraeus

Rotofix 32 Hettich

Sepatech Biofuge A Heraeus

Sepatech Biofuge 15 Heraeus

Sepatech Biofuge 15R Heraeus

Varifuge 3.2RS Heraeus

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Eppendorfreaktionsgefäße: 0,5 ml und 1,5 ml	Sarstedt
Centriprep-10	amicon
Combitip plus 2,5 ml und 5 ml	Eppendorf
Elektroporationsküvetten, steril, 0,2 cm	Invitrogen
Filterpapier Whatmann 3 mm	Schleicher & Schüll
Glasfaserfilter Printed Filtermat A, Größe 90 x 120 mm	Wallac
Kanülen	
Sterican [®] Luer-Lock, 0,9x40 mm ² , 20 G x 1,5“, Gr.1	Braun
Sterican [®] Luer-Lock, 0,8 x 40 mm ² , 21 G x 1,5“, Gr.2	Braun
Sterican [®] Luer-Lock, 0,40 x 12 mm ² , 27 G x 0,5“	Braun
Mikrotiterplatten	
Polystyrol-Microplatten 96 K , U-Form	Greiner
Nunc [™] Mikrowell Platten Flach- und Rundboden	
96 well mit Deckel	Nunc
Polyethylenterephthalat-Mikroplatten (PET) 96 well	
für 1450 MicroBeta [™]	Wallac
Nitrocellulosemembran: 30 cm x 3 m, 0,1 µm, PH79, 402096	Schleicher & Schüll
Nylonwatte	Biotest
PD-10 Leersäulen	Pharmacia
Polyethylen (PE)-Röhrchen 0,6 ml und 12 ml	Greiner
Pipettenspitzen für Eppendorfpipetten, alle Größen	Sarstedt
Plate sealers Top Seal [™] -A für 96-well microplates	Packard
Rundbodenröhrchen, steril 12 ml	Greiner
Spitzbodenröhrchen, steril, 15 ml und 50 ml	Falcon
Spritzen	
Injekt [®] 10ml Luer	Braun
Injekt [®] 20ml Luer	Braun
Omnifix [®] 5ml Luer	Braun
Omnifix [®] 40, 1ml, U-40 Insulin	Braun
Sterilfilter	
Celluloseacetat 0,8 µm	Satorius
Millex [®] -GV 0,22 µm	Millipore

Zellkulturflaschen, für Suspensions- und adhärenente Zellen

Polystyrol, 15cm ² , 50 ml	Greiner
Polystyrol, 75 cm ² , 250 ml	Greiner
Polystyrol, 250cm ² , 600 ml	Greiner
Nunclon™ mit Filterdeckel, 25 cm ² und 80 cm ²	Nunc

2.1.3 Chemikalien

Aceton	Merck
Agarose, ultraPURE [®] , Elektrophoresegrad	Gibco BRL
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin, Na ⁺ -Salz	Serva
Ampuwa	Fresenius
Avidin	Sigma
Bacto-Agar	Difco Laboratories
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories
Bacto-Trypton	Difco Laboratories
Barbital-Natrium (Natriumsalz der 5,5-Diethylbarbitursäure)	Merck
Biotin-Peroxidase	Sigma
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Serva
5-Brom-4chlor-3indolylphosphat-p-toluidinsalz (BCIP)	Roth
Carboxymethylcellulose (CMC)	Fluka
Calciumchlorid	Sigma
Chloroform, z.A.	J.T. Baker
Chloroform/iso-Amylalkohol (49+1)	Fluka
4-Chloro-1-naphtanol	Sigma
⁵¹ Chrom Natriumchromat in wässriger Lösung	Amersham
Cobra Venom Faktor (CVF)	Sigma
D-Glukose	Merck
Glykogen (20 mg/ml)	Böhringer
3,3 Diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB)	Sigma
Diethanolamin	Sigma
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma

Dithiotreitol (DTT)	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol 98%	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamin-N,N,N,N'-tetraacetat (EDTA)	Merck
Formalin	Merck
Formamid	Sigma
Gelatine	J. T. Baker
γ -Globulin vom Rind	Sigma
Glycerin	Merck
Glycin	Merck
Glykogen (20 mg/ml)	Böhringer
Guanidiniumisothiocyanat (ultraPURE [®])	Gibco BRL
N'-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Biomol
Iso-Amylalkohol	Sigma
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Sigma
Kochsalzlösung isotonisch	Braun
Magermilchpulver Glücksklee	Nestlé
Magnesiumchlorid	J.T. Baker
Magnesiumsulfat	Riedel-de Haën
Meerschweinchen Komplementprotein C5	eigene Arbeitsgruppe
2-Mercaptoethanol	J.T. Baker
Methanol 96%	J.T. Baker
Mineralöl	Sigma
Molekulargewichtsmarker für DNA-Agarosegele	
100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas
1 kb DNA Ladder	GibcoBRL
Molekulargewichtsmarker für RNA-Agarosegele	
0,24-9,5 Kb RNA Ladder	GibcoBRL
Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE	
Molecular weight high und low range	BioRad
Molecular weight prestained	Sigma

3- Morpholinopropan-sulfonsäure (MOPS)	Fluka
Natriumacetat	Riedel-de Haën
Natriumazid	J.T.Baker
Natriumchlorid	Merck
Natriumdedocanylsulfat (SDS)	Biomol
Natriumdihydrogenphosphat	J.T. Baker
Natriumhydrogencarbonat	J.T. Baker
Natriumhydrogenphosphat	J.T. Baker
Natriumthiosulfat	Merck
Natriumzitat	J.T. Baker
4-Nitrophenylphosphat (PNPP)	Boehringer
p-Nitrotetrazoliumblausäure (NBT)	Roth
N-Ethylmaleimid	Sigma
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ -Primer	Böhringer
Pepstatin A	Fluka
Percoll [®] (d= 1,13 g/ml)	Pharmacia
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka
Ponceau S	Sigma
Protein L	ACTigen
Rinder-Albumin Fraktion V (BSA)	AppliChem
RotiPhenol [®]	Roth
Rotiphorese [®] Gel 30 (30% Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid)	Roth
Sarcosyl	Sigma
Salzsäure 37%	Riedel-de Haën
Sepharose 4B, CNBr-aktiviert	Pharmacia
Silbernitrat	Merck
Szintillisationsflüssigkeit	
Optiphase 'SuperMix' für ⁵¹ Cr	Wallac
Betaplate Scint für ³ H	Wallac
³ H-Thymidin (Methyl- ³ H-Thymidin)	NEN™ Life Science
Trichloressigsäure	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck
Triton X-100	Sigma
Tween-20	J.T. Baker

Wasser für Injektionszwecke	Braun
Wasserstoffperoxid 30%	Merck
Zitronensäure	Merck

2.1.4 Narkotika und Medikamente

Diethylether, wasserfrei, 99,8%	J.T. Baker
Ketamin [®] 10%	WDT
Rompun [®]	Bayer Vital
Epoprostenol	Glaxo Welcome
Ampicillin-ratiopharm [®] 0,5 Injektionslösung	ratiopharm
Arava [®] 100 Filmtabletten	Hoechst Marion Roussel
Malonitrylamid (MNA)	Hoechst Marion Roussel
Sandimmun [®] Optoral	Sandoz
Refobacin [®] 10 mg Ampullen	Merck

2.1.5 Lösungen und Puffer

Acid-Citrat-Dextrose (ACD)

- 35 mM Zitronensäure
- 75 mM Natriumzitat
- 121 mM D-Glukose

AP-Puffer für Immunblot

- 100 mM Tris/HCl
- 100 mM NaCl
- 5 mM MgCl₂

Aufschlusspuffer für SDS-PAGE

- 500 mM Tris/HCl pH 6,8
- 25% Glycerin
- 2% SDS
- 0,1% Bromphenolblau
- 200 mM DTT

BCIP Stock

- 25 mg/ml in DMF
- Lagerung bei -20°C

BCIP/NBT Substratlösung für alkalische Phosphatase

66 µl NBT-Stock

66 µl BCIP-Stock

10 ml AP-Puffer

Diaminobenzidin-Substratlösung für Immunhistochemie

20 mg DAB in 100 ml PBS

kurz vor Gebrauch Zugabe von 12 µl H₂O₂ 30%

Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE

0,05 M Tris

0,384 M Glycin

0,1% SDS

Elutionspuffer für HiTrap®

20 mM Phosphat

0,5 M NaCl

300 mM Imidazol

vor Gebrauch sterilfiltrieren (0,8 µm)

Elutionspuffer für Protein G

0,1M Glycin/HCl pH 2,7

vor Gebrauch sterilfiltrieren (0,8 µm) und entgasen

Entwickler für Silberfärbung von SDS-Gelen

6% Na₂CO₃

0,0004% Na₂S₂O₃

0,02% Formalin

Erythrozyten-Lysereagenz

0,83% NH₄Cl

10 mM EDTA

12 mM NaHCO₃

Extraktionspuffer für Membranextrakte

0,5% Triton X-100

0,05 M NaCl

0,05 M Tris/HCl

0,36 mM Pepstatin A

1 mM PMSF

10 mM N-Ethylmaleimid

pH 7,4, Lagerung bei 4°C

First Strand Buffer für Reverse Transkription 5x

GibcoBRL

- 250 mM Tris/HCl, pH 8,3
- 375 mM KCl
- 15 mM MgCl₂

Fixierlösung für Silberfärbung von SDS-Gelen

- 50% Methanol
- 12% Essigsäure
- 0,02% Formalin

GEBS

- 20% Glycerin
- 50 mM EDTA
- 0,5% Bromphenolblau
- 0,5% Sarcosyl

NEB 2 Puffer für *Bst*N1-Verdau

New England Biolabs

- 50 mM NaCl
- 10 mM Tris/HCl
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM DTT
- pH 7,7

NBT Stock

- 50 mg/ml NBT in 70% DMF
- Lagerung bei -20°C

PBS (Phosphat gepufferte Saline)

- 10 mM Natriumphosphat, pH 7,4
- 2,7 mM KCl
- 15 mS mit NaCl einstellen (ca. 137 mM NaCl)

PBS 160 mM

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10 mM Na₂HPO₄
- 10 mM KH₂PO₄
- pH 7,4
- vor Gebrauch sterilfiltrieren (0,8 µm) und entgasen

Percoll[®], d= 1,086, 320 mOs/kg H₂O

10 ml 1,5 M NaCl
61,7 ml Percoll[®], d= 1,13 g/ml
ad 100 ml destilliertes Wasser

***pfu*-Polymerase Puffer 10x**

Stratagene

200 mM Tris/HCl, pH 8,8
20 mM MgSO₄
100 mM KCl
100 mM (NH₄)₂SO₄
1% Triton X-100
1 mg/ml BSA

Ponceau S Lösung

20 g Ponceau S in 100 ml Trichloressigsäure 30%
Gebrauch: 2% in destilliertem Wasser

Puffer A (Präparation von Thrombozyten)

2,6 M NaCl
53 mM KCl
238 mM NaHCO₃
5,6 mM Na₂HPO₄

Puffer B (Präparation von Thrombozyten)

5 ml Puffer A
1 ml 0,1 M MgCl₂
0,1 g Glucose
0,2 g BSA
94 ml H₂O

Puffer C (Präparation von Thrombozyten)

10 ml Puffer C
0,6 ml ACD

Puffer F (Aufreinigung CVF)

20 mM Tris/HCl, pH 7,4
vor Gebrauch sterilfiltrieren (0,8 µm) und entgasen

Puffer G (Aufreinigung CVF)

20 mM Tris/HCl, 350 mM NaCl, pH 7,4
vor Gebrauch sterilfiltrieren (0,8 µm) und entgasen

React 2 Puffer 10x für *Sfi*I-Verdau

Gibco BRL

500 mM Tris/HCl, pH 8,0
100 mM MgCl₂
500 mM NaCl

React 3 Puffer 10x für *NotI*-Verdau

Gibco BRL

500 mM Tris/HCl, pH 8,0
100 mM MgCl₂
1M NaCl

RNA-Auftragspuffer

50% Formamid
2,2 M Formaldehyd
10 mM EDTA
20% Glycerol
0,2% Bromphenolbalu
50 µg/ml Ethidiumbromid

RNA-Laufpuffer

20 mM MOPS, pH 7,0
8 mM NaOAc
1mM EDTA, pH 8,0

RNA Stammlösung D

4 M Guanidiniumisothiocyanat
25 mM Na-citrat, pH 7,0
0,5% Sarcosyl

Sammelgel für SDS-PAGE

125 mM Tris/HCl, pH 6,8
0,1% SDS
3% Polyacrylamid

Startpuffer für HiTrap®

20 mM Phosphat
0,5 M NaCl
15 mM Imidazol
vor Gebrauch sterilfiltrieren (0,8 µm)

Startpuffer für Protein G

0,02 M Na-Phosphat pH 7,0
vor Gebrauch sterilfiltrieren (0,8 µm) und entgasen

Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex

Streptavidin 1:100 in PBS

Biotin-Peroxidase 1:1000 in PBS

zu gleichen Teilen (1:1) mischen, bei 4°C aufbewahren

T4-Ligase Puffer 10x

New England Biolabs

50 mM Tris/HCl

10 mM MgCl₂

10 mM DTT

1 mM ATP

25 µg/ml BSA

pH 7,5

taq-Polymerase-Puffer 10x

Gibco BRL

200 mM Tris/HCl, pH 8,3

500 mM KCl

TBE für DNA-Agarosegele

8,9 mM Tris/HCl, pH 8,3 bis 8,5

8,9 mM Borsäure

0,2 mM EDTA

TBS (Tris gepufferte Saline)

50 mM Tris/HCl

200 mM NaCl

pH 7,4

TBS für Immunblot

20 mM Tris/HCl

150 mM NaCl

pH 7,4

TBS Waschpuffer für Immunblot

TBS für Immunblot

0,5% Tween 20

TBS Waschpuffer für XNA-ELISA

TBS

0,3% Tween-20

0,02% NaN₃

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,5

1 mM EDTA

Transferpuffer für Western Blot

25 mM Tris
150 mM Glycin
10% Methanol
pH 8,5

Trenngel für SDS-PAGE

375 mM Tris/HCl, pH 8,8
0,1% SDS
7%, 7,5% oder 12% Polyacrylamid

VBS Stammlösung (Veronal gepufferte Saline)

750 mM NaCl
25 mM Barbitol-Natrium
pH 7,3
Lagerung bei 4°C

VBS++ Puffer

VBS Stammlösung 1: 5 in destilliertem Wasser
0,1% Gelatine
0,5 mM MgCl₂
37,5 µM CaCl₂
direkt vor Gebrauch ansetzen

2.1.6 Nährmedien**SOB-Medium**

2% Trypton
0,5% Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl

SOC-Medium

SOB-Medium
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose

2x TY-Medium

- 1,6% Trypton
- 1% Hefeextrakt
- 0,5% NaCl

2x TY + Amp + Gluk

- 2x TY-Medium
- 100 µg/ml Ampicillin
- 1% Glukose

TYE-Agar

- 1% Trypton
- 0,5% Hefextrakt
- 0,8% NaCl
- 1,5% Bacto-Agar

TYE + Amp + Gluk

- TYE-Agar
- 100 µg/ml Ampicillin
- 1% Glukose

2.1.7 Antikörper

Kaninchen anti-asialo GM1	Wako
Kaninchen anti-Maus IgG-Biotin	Dako
Kaninchen anti-Ratte IgM-Alkalische Phosphatase	Zymed
Kaninchen anti-Schaf Erythrozytenstroma	Sigma
Maus anti-c-Myc IgG1, Klon 9E10	Sigma
Maus anti-human C6	ICN
Maus anti-human C9	ICN
Maus anti-Ratte C3, Klon ED11	Serotec
Maus anti-Ratte IgM, Klon MARM-4	Serotec
Maus anti-Ratte Makrophagen, Klon ED1	Serotec
Maus anti-Ratte CD161(NKR-P1)	Serotec
Maus anti-Ratte CD5-FITC, Klon MRC OX-19	Serotec
Maus anti-Ratte CD45RA-RPE, Klon OX-33	Serotec
Monoklonaler Antikörper (mAk) 122	eigene Arbeitsgruppe
Ratte IgM kappa Myeloma	Serotec

Ratte IgG, gereinigt	Serotec
Schaf anti-Ratte IgG -Alkalische Phosphatase	Serotec
Ziege anti-Maus Ig-FITC	Becton Dickinson
Ziege anti-Maus IgG-Peroxidase	Sigma

2.1.8 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

<i>NotI</i> , <i>SfiI</i>	Gibco BRL
<i>BstNI</i>	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Superscript™ II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase (200 U/μl)	GibcoBRL
<i>pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	Stratagene
<i>taq</i> -DNA-Polymerase (5U/μl)	Gibco BRL

2.1.9 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> HB 2151	K12; <i>ara</i> , $\Delta(lac-proAB)$, <i>thi-1</i> , [F' <i>proA⁺B⁺</i> , <i>lacI^q</i> Z Δ M15] Carter <i>et al.</i> , 1985
<i>E.coli</i> TG1	K12, <i>supE</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(lac-proAB)$, $\Delta(mcrB-hsdSM)5$, (<i>r_K⁻</i> <i>m_K⁻</i>), [F' <i>traD36</i> , <i>Pro A⁺B⁺</i> , <i>lacI^q</i> Z Δ M15] Stratagene

2.1.10 Phagemid-Vektoren

pCANTAB6	Vaughan <i>et al.</i> , 1996
pHEN1 mit MS C5-spezifischen scFvs (Klone B3,E10,H10 und F11)	Güteryüz, 1998

2.1.11 Zelllinien

JH 4: Fibroblastenartige Meerschweinchen Zelllinie isoliert aus der Lunge eines Jungtiers vom Stamm 13, adhären.

ATCC CCL-158

3.2.3: Hybridomzelllinie, von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kurt Wonigeit, Abteilung für Abdominal- und Transplantationschirurgie der MHH zur Verfügung gestellt.

YAC-1: Lymphomzelllinie, die durch Inokulation des Moloney Leukämie Virus (MLV) in neugeborene A/Sn Mäusen induziert wurde.

Von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kurt Wonigeit, Abteilung Abdominal- und Transplantationschirurgie der MHH zur Verfügung gestellt.

2.1.12 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Cell Dissociation Solution (1x), nicht enzymatisch	Sigma
Concanavalin A (Con A)	Sigma
DMEM high Glucose (1x)	PAA
DMSO Dimethylsulfoxid Hybr Max [®]	Sigma
Fetales Kälberserum, bei 56°C hitzeinaktiviert (FCS)	Sigma
HybridMed Seromed [®]	Biochrom
L-Glutamin	Gibco BRL
Methyl- α -D-Mannopyranosid	Sigma
Nutrient Mixture F-12K Kaighn's Modification (1x) mit L-Glutamin	Gibco BRL
Penicillin (10000 IU/ml) / Streptomycin (10mg/ml)	Sigma
RPMI 1640 mit L-Alanyl-L-Glutamin	Gibco BRL
TC 199 mit Hank's Salzen	Applichem
Trypanblau 0,4%	Sigma
Trypsin/EDTA (1x) (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA in PBS)	Gibco BRL

2.1.13 Sonstiges

Schafsblut	konserviert, laut Herstellerangaben gewaschen und auf 4% Erythrozyten eingestellt	Behring
BCA Proteinbestimmungs- kit		Pierce
Histidin-Tryptophan-Ketoglu- turat Lösung		Bretschneider
Jetsorb 300 Gel Extraktions Kit		Genomed
dNTP-Mix (2'-Deoxynucleosid 5'-Triphosphat) Ultrapure		Amersham
Oligo-(dT) ₁₂₋₁₈		Amersham
TUNEL Testkit zum Nachweis von Apoptose		Böhringer

2.1.14 Verwendete Tierstämme

Lewis Ratten, männlich	Zucht des Zentralen Tierlabors der MHH oder Charles River Laboratories
PVG/C6- Ratten, männlich	eigene Zucht, Zentrales Tierlabor der MHH, von M Daha, Universität Leiden zur Verfügung gestellt.
Dunkin Hartley Meerschweinchen	Charles River Laboratories
C2BB/R+ Meerschweinchen	eigene Zucht, Zentrales Tierlabor der MHH
C2BB/R- Meerschweinchen	eigene Zucht, Zentrales Tierlabor der MHH
C57BL/6 Mäuse	Zucht des Zentralen Tierlabors der MHH

2.2 Methoden

2.2.1 Charakterisierung von Proteinen

Um Proteine zu charakterisieren, wurden sie nach Laemmli (1970) unter denaturierenden Bedingungen im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE) und anschließend durch Silberfärbung dargestellt oder alternativ mit der von Towbin *et al.* (1979) entwickelten Methode des Western Blots auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und immunologisch nachgewiesen (vgl. 2.2.6.3). Zusätzlich wurde der Gesamtproteingehalt mit der BCA-Methode bestimmt (vgl. 2.2.1.3).

2.2.1.1 Auftrennung von Proteinen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Gel mit einer Dicke von 1 mm und einer Größe von 8,5 x 6 cm bestand je nach zu charakterisierendem Protein aus einem 7%-, 7,5%- oder 12%igen Trenngel, das mit einem 3%igen Sammelgel überschichtet war, wobei die Polymerisation jeweils durch Zugabe von 0,1% TEMED und 0,1% Ammoniumpersulfat gestartet wurde. Die Proben wurden 1:1 im Aufschlusspuffer mit dem Reduktionsmittel Dithiothreitol verdünnt, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und in 4 mm breite Taschen des Sammelgels aufgetragen. Ein Molekulargewichtsmarker als Größenvergleich wurde zusammen mit den Proben zunächst im Sammelgel bei 100 V und nach Erreichen des Trenngels bei 200 V in Elektrophoresepuffer aufgetrennt.

2.2.1.2 Silberfärbung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine

In der Silberfärbung werden Proteine durch Komplexbildung mit Silberionen schwarzbraun angefärbt (Qiagen, 1998). Nach Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE wurde das Gel für 30 Minuten in der Fixierlösung inkubiert, dreimal für 10 Minuten mit 50% Ethanol gewaschen und anschließend für 1 Minute in 0,02% Natriumthiosulfat inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in destilliertem Wasser (20 Sekunden) wurde für 20 Minuten eine 0,2%ige Silbernitratlösung, ergänzt mit 0,03% Formalin, zugegeben. Nach Zugabe des Entwicklers verschob sich der pH-Wert in den alkalischen Bereich, und es bildete sich elementares Silber. Nicht komplexierte Silberionen wurden mit destilliertem Wasser (zweimal 20 Sekunden) gewaschen und die Reaktion durch 10 minütige Inkubation mit einer Stopplösung aus 50% Methanol und 12% Essigsäure beendet.

2.2.1.3 Bestimmung des Proteingehaltes nach der BCA-Methode

Der Gesamtproteingehalt einer Lösung wurde mit einer Kombination aus der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) und des kolorimetrischen Nachweises von Cu^{1+} mittels Bicinchoninsäure (BCA) ermittelt. Dazu wurde ein käuflich erworbener BCA Proteinnachweistest mit dem enthaltenen Albuminstandard oder einem IgG-Standard (γ Globulin) verwendet.

2.2.2 Aufreinigung und Bestimmung der Aktivität von Cobra Venom Faktor (CVF)

Der krude Extrakt von lyophilisiertem Cobra Venom Faktor (CVF) wurde nach der von Beukelman *et al.* (1987) beschriebenen Methode mit Hilfe der FPLC (**F**ast **P**rotein **L**iquid **C**hromatography) über einen Anionenaustauscher aufgereinigt. Anschließend wurde die antikomplementäre Aktivität von CVF *in vitro* gegen normales humanes Serum (NHS) und *in vivo* nach Applikation in Ratten im hämolytischen Test ermittelt.

2.2.2.1 Aufreinigung von CVF

Um CVF über einen Anionenaustauscher (Mono Q) aufzureinigen, wurden 200 bis 350 mg des kruden Extraktes in 10 bis 15 ml Puffer F gelöst und unlösliche Bestandteile bei 4000 g für 15 Minuten abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde durch ein Sterilfilter (0,22 μm) filtriert und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die nach Herstellervorschrift mit Puffer F äquilibrierte Mono Q Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 100 ml Puffer F bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min wurden die Proteine mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 350 mM NaCl (kontinuierliche Zumischung von Puffer G zu Puffer F) aufgetrennt, unterbrochen von einer 50-minütigen Elution bei 260 mM NaCl (74,3% Puffer G). Ab 175 mM NaCl (50% Puffer G) wurden 80 Elutionsfraktionen à 1ml gesammelt. Fraktionen, die aufgrund einer erhöhten OD bei 280 nm Proteine enthielten, wurden in der SDS-PAGE (7,5%iges Trenngel) mit anschließender Silberfärbung auf ihre Reinheit hin überprüft (vgl. 2.2.1.1 und 2.2.1.2). Elutionsfraktionen, die 2 Banden bei etwa 50 und 66 kD aufwiesen, wurden gepoolt und der Proteingehalt nach der BCA-Methode bestimmt (vgl. 2.2.1.3).

2.2.2.2 Bestimmung der antikomplementären Aktivität von CVF *in vitro* und *in vivo*

Zur Überprüfung der antikomplementären Aktivität *in vitro* wurden unterschiedliche Verdünnungen von aufgereinigtem CVF mit normalem humanem Serum (NHS) 30 Minuten bei 37°C inkubiert und dann im hämolytischen Test eingesetzt (vgl. 2.2.2.3). Dazu wurde die Menge NHS eingesetzt, welche eine 50%ige Lyse erzeugt (eine CH50 Einheit). Unter Verwendung der unter 2.2.2.3 beschriebenen Formeln entspricht eine Einheit CVF der Menge, die die Hämolyse einer CH50 Einheit Serum zu 50% inaktiviert.

Um die Inhibition des Komplementsystems durch CVF *in vivo* zu untersuchen, wurden Lewis Ratten (Gewicht 280 bis 350 g) an 2 aufeinander folgenden Tagen 40 und 20 IU, 80 und 40 IU, 50 und 20 µg sowie zweimal 50 µg bzw. 80 und 40 IU aufgereinigter CVF intravenös bzw. intraperitoneal verabreicht. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde das Serum der Tiere gewonnen und unverdünnt im hämolytischen Test analysiert (vgl. 2.2.2.3). Als Bezugsgröße (100% Hämolyse) diente die Hämolyse, die das individuelle Serum vor CVF-Gabe erzielte.

2.2.2.3 Hämolytischer Test

Die Komplementaktivität in Seren sowie die antikomplementäre Aktivität von CVF gegen normales humanes Serum (NHS) wurden im hämolytischen Test durch Lyse von sensibilisierten Schafserythrozyten in Anlehnung an die von Whaley und North (1997) beschriebenen Methode ermittelt.

Erythrozyten aus Schafsblut wurden mit VBS++ Puffer auf 2% eingestellt und zur Sensibilisierung mit dem gleichen Volumen einer 1:100 Verdünnung des Kaninchen anti-Schaf Erythrozytenstroma Antikörpers in VBS++ Puffer bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die sensibilisierten Schafserythrozyten wurden bei 2000g, 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert, zweimal mit VBS++ Puffer gewaschen und in VBS++ Puffer aufgenommen, so dass eine Endkonzentration von 1×10^9 /ml erzielt wurde. Das Lysat aus 100 µl Zellsuspension mit 2,9 ml destilliertem Wasser ergab bei korrekter Zellzahl eine OD bei 541 nm von 0,370.

In den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit Rundboden wurden je 45 µl unterschiedliche Serumverdünnungen in VBS++ Puffer zusammen mit 30 µl der sensibilisierten Schafserythrozyten bzw. VBS++ Puffer (Leerwert) für 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 170 µl eiskalter, isotonischer Kochsalzlösung abgestoppt. Zur Ermittlung der totalen Lyse wurden 30 µl sensibilisierter Schafserythrozyten mit 45 µl VBS++ Puffer anstatt Serum inkubiert und durch Zugabe von 170 µl destilliertem Wasser lysiert. Die Zellen wurden anschließend bei 1000 g, 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert, 200 µl des Überstandes in eine neue Platte überführt und die OD bei 540 nm bestimmt.

Die prozentuale Lyse jeder Probe wurde durch folgende Formel ermittelt:

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{OD}_{540} \text{ Probe} - \text{OD}_{540} \text{ Leerwert}}{\text{OD}_{540} \text{ totale Lyse} - \text{OD}_{540} \text{ Leerwert}} \times 100$$

Zur Ermittlung einer CH50 Einheit, also dem Serumvolumen, das eine 50%ige Hämolyse erzeugt, wurde die prozentuale Lyse der Probe als Dezimalzahl (y) in folgende Formel eingesetzt:

$$y / (1-y) .$$

Das Ergebnis wurde in einem Graphen mit logarithmischer x- und y-Achse gegen das eingesetzte Serumvolumen aufgezeichnet. Nach Verbindung der einzelnen Punkte zu einer Geraden wurde das Serumvolumen mit $y / (1-y) = 1$ bestimmt.

2.2.3 Charakterisierung und Verwendung von scFvs gegen Meerschweinchen C5 und C5a

In der Arbeitsgruppe standen Phagemid-Vektoren (pHEN1) mit Antikörpern gegen die Meerschweinchen (MS) Komplementproteine C5 und C5a zur Verfügung, die nach Generierung von scFv-Antikörperbanken aus Blut und Milz von mit MS C5 immunisierten Mäusen durch Selektion mittels Phage-Display isoliert worden waren (Güleryüz, 1998). Es handelte sich dabei um 4 gegen MS C5 gerichtete Klone (B3, H10, E10 und F11), die nach Restriktionsverdau der DNA mit *Bst*NI unterschiedliche Muster zeigten und keine Kreuzreaktivität mit MS C5a, humanem C5 oder humanem C5a aufwiesen. Ferner war ein MS C5a-spezifischer Klon (D10) vorhanden, der zwar nicht mit humanem C5 oder C5a jedoch mit MS C5 kreuzreagierte. Im Laufe dieser Arbeit wurden die Klone sequenziert und die MS C5-spezifischen scFvs über Metalchelate-Chromatographie kombiniert mit Gelfiltration oder über Affinitätschromatographie an Protein L aufgereinigt. Für die Aufreinigung über Metalchelate-Chromatographie war es erforderlich, die scFvs in den Phagemid Vektor pCANTAB6 umzuklonieren. Die aus diesem Vektor exprimierten scFvs erhalten einen C-terminalen 6x Histidin Rest, der die Chelatbindung an immobilisierte Metallionen ermöglicht.

Nach Affinitätsbestimmung der gegen MS C5 gerichteten scFvs wurde ihre Eignung zur Inhibition des Komplementsystems *in vitro* und die Fähigkeit zum Nachweis von MS C5-Ablagerungen im Gewebe untersucht. Außerdem wurde mit einem MS C5-spezifischen scFv eine Methode zur C5-Konzentrationsbestimmung im Serum etabliert.

2.2.3.1 Sequenzierung

Unter Verwendung der Primer Kombination JK61 und JK77 (s. Anhang) wurde die Sequenzierung der Phagemid DNA (pHEN1-Vektor) von der Firma GATC GmbH durchgeführt. Die Subgruppierung erfolgte in Anlehnung an die Klassifikation von Kabat *et al.* (1991).

2.2.3.2 Umklonierung in den Vektor pCANTAB6

Für die Aufreinigung über Metal-Chelatchromatographie wurden die DNA-Fragmente für die anti-MS C5 scFvs (Inserts) in den Phagemid Vektor pCANTAB6 umkloniert. Dazu wurden die im Phagemid Vektor pHEN1 vorliegenden inserierten DNA-Abschnitte der scFvs zunächst mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkoholfällung wurden die Inserts sowie der alkoholfällte Phagemid Vektor pCANTAB6 mit den Restriktionsenzymen *Sfi*I und *Not*I verdaut. Der geschnittene Vektor wurde in einem DNA-Agarosegel aufgetrennt und über Glasmilchbeads aus dem Gel aufgereinigt. Die geschnittenen Inserts wurden nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkoholfällung mit dem aufgereinigten, geschnittenen Vektor ligiert und anschließend in *E. coli* elektrotransformiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Umklonierung wurden die nun im Vektor pCANTAB6 inserierten DNA-Abschnitte für die anti-MS C5 scFvs in der PCR amplifiziert, mit dem Restriktionsenzym *Bst*NI verdaut und in einem Agarosegel die Größe der Inserts bzw. die Restriktionsmuster analysiert.

2.2.3.2.1 Amplifikation der scFv-Gene in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) nach der Methode von Saiki *et al.* (1988) können in einem *in vitro*-Verfahren Nukleinsäure-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuren selektiv angereichert werden. Hierbei wird ein DNA-Fragment (Template) mit einer thermostabilen DNA-Polymerase durch sequentielle Erwärmungs- und Abkühlungsschritte vervielfältigt. Die DNA-Polymerase synthetisiert einen zum Template (Einzelstrang DNA) komplementären Strang, ausgehend von einem synthetischen Oligonukleotid-Primer, der spezifisch am Template hybridisiert (Annealing). Ein Amplifikationszyklus besteht aus einer dreiteiligen Reaktion: 1. Hitze-Denaturierung des Templates, 2. Annealing der Primer und 3. Extension.

Als DNA-Polymerase wurde für die Amplifikation der umzuklonierenden Inserts die *pfu*-Polymerase eingesetzt, die im Vergleich zu der sonst verwendeten *taq*-Polymerase eine höhere Ablesegenauigkeit besitzt damit eine geringere Fehlerrate beim amplifizierten DNA-Fragment verursacht. Dies kommt durch die „proof-reading“-Aktivität der *pfu*-Polymerase zustande, die aufgrund einer 3'→5' Exonuklease-Aktivität falsch eingebaute Nukleotide wieder entfernen kann.

Reaktionsansatz für Amplifikation mit *pfu*-DNA-Polymerase:

10 µl 10x <i>pfu</i> -Polymerase-Puffer	(1 x im Ansatz)
0,8 µl dNTP-Mix (je 25 mM)	(Konzentration im Ansatz : 200 µM)
2 µl Primer 1 (10 µM)	(Konzentration im Ansatz: 20 nM)
2 µl Primer 2 (10 µM)	(Konzentration im Ansatz: 20 nM)
xx µl Template	
Aqua dest. ad 100 µl	

Reaktionsansatz für Amplifikation mit *taq*-Polymerase:

10 µl 10x <i>taq</i> -Polymerase-Puffer	
3 µl MgCl ₂ (50 mM)	(Konzentration im Ansatz: 1,5 mM)
0,8 µl dNTP-Mix (je 25 mM)	
2 µl Primer 1 (10 µM)	
2 µl Primer 2 (10 µM)	
xx µl Template	
Aqua dest. ad 100 µl	

Zum Schutz vor Verdampfen von Wasser aus dem Reaktionsgemisch während der PCR wurden die Ansätze mit Mineralöl überschichtet. Für jeden Ansatz wurde zudem eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt, um Kontaminationen auszuschließen.

Zur Amplifikation der scFv-Gene aus dem Phagemid Vektor pHEN1 bzw. pCANTAB6 wurden die Primer JK61 und JK71 bei einer Annealingtemperatur von 50°C bzw. AW1 und JK52 (vgl. Anhang) bei einer Annealingtemperatur von 45°C in einer „hot start“ PCR eingesetzt, d.h. die PCR wird zunächst ohne Polymerase gestartet und durchläuft einen Denaturierungs- und Annealing-Zyklus. Erst wenn die Primer mit dem Template hybridisiert sind, wird die Extension durch Zugabe der Polymerase (5 units/100 µl PCR-Ansatz) gestartet. Diese Methode liefert eine hohe Ausbeute an korrektem PCR-Produkt.

Für die PCR-Ansätze wurden folgende Reaktionsbedingungen im Thermocycler gewählt:

Vorzyklus (1 x)	94°C	10sec+300sec	(Denaturierung)
	XX°C	10sec+50sec	(Annealing)
Break und hot start			
Hauptzyklus (30 x)	72°C	60sec+60sec	(Extension)
	94°C	10sec+80sec	(Denaturierung)
	XX°C	10sec+110sec	(Annealing)
Endzyklus (1 x)	72°C	60sec+600sec	(Extension)
	25°C	10sec	

2.2.3.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Für eine Phenol-Chloroform-Extraktion wurde resuspendierte DNA mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/iso-Amylalkohol (25 Teile/24 Teile/1 Teil) kräftig gemischt (Denaturierung von Proteinen, z.B. Polymerasen, Restriktionsenzyme) und zur Phasentrennung bei 13 000 g, 1 Minute zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase (enthält DNA) wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Chloroform/iso-Amylalkohol (24 Teile/1 Teil) kräftig gemischt (Abtrennung von Phenolresten). Zur Steigerung der Ausbeute wurde nach erneuter Zentrifugation der in der oberen, wässrigen Phase verbleibende Chloroform/iso-Amylalkohol-Rest mit 100 µl destilliertem Wasser nachextrahiert.

2.2.3.2.3 Alkoholfällung von DNA

Nukleinsäuren können in einer 65 bis 70%igen alkoholischen Lösung bei gleichzeitiger Anwesenheit von monovalenten Kationen präzipitiert werden. Niedrige Temperaturen und Glykogen als Carrier begünstigen diesen Vorgang.

Die in destilliertem Wasser oder TE-Puffer resuspendierte DNA wurde mit 1/10 ihres Volumens 2,5 M Natriumazetat, pH 5,2, 1µl Glykogen und dem 2,5-fachen des neu entstandenen Volumens Ethanol 96% (-20°C) gemischt. Zur Fällung wurde der Ansatz für 1 Stunde bei -70°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde für 30 Minuten bei 4°C und 13 000 g pelletiert, zweimal mit 500 µl Ethanol 70% (-20°C) gewaschen und nach Trocknung bei 37°C in TE-Puffer oder destilliertem Wasser resuspendiert.

2.2.3.2.4 SfiI-Verdau

Für die Umklonierung wurden 2 µg des Phagemid-Vektors pCANTAB6 und je 50 µl der durch PCR amplifizierten scFv Inserts der Klone B10, E10, H10 und F11 (maximal 2,5 µg) nach Alkoholfällung bzw. Phenol-Chloroform-Extraktion/Alkoholfällung eingesetzt. Die DNA wurde in 12 µl destilliertem Wasser resuspendiert und nach Zugabe von je 1,5 µl 10x React 2 Puffer und 1,5 µl *Sfi*I (10 U/µl) mit Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet. Diese Mischung wurde über Nacht (16 Stunden) bei 50°C inkubiert und danach wurde der Verdau durch Hitzeinaktivierung (10 Minuten, 65°C) abgestoppt.

2.2.3.2.5 NotI-Verdau

Zu den Ansätzen des *SfiI*-Verdau wurden je 1,5 µl 10x React 3 Puffer, 3,33 µl 500 mM NaCl und 1 µl *NotI* (15 U/µl) zugegeben und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten abgestoppt.

Beim Schneiden des Vektors wurde ein ca. 700 bp langes Fragment (scFv spezifisch für MS C3) herausgeschnitten. Um dieses Insert abzutrennen und gleichzeitig den Verdau zu kontrollieren, wurde der Verdauansatz (30 µl) nach Zugabe von 10 µl GEBS über ein 1% iges Agarosegel und anschließend über Glasmilchbeads aufgereinigt (vgl. 2.2.2.2.6 und 2.2.2.2.7). Die verdauten Inserts wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkoholfällung aufgereinigt (vgl. 2.2.2.2.2 und 2.2.2.2.3).

2.2.3.2.6 Auftrennen von DNA in einem Agarosegel

Für analytische und präparative Zwecke wurden DNA-Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der Gele wurde in Abhängigkeit von den zu erwartenden Fragmentlängen zwischen 1 und 3% gewählt. Die entsprechende Agarosemenge wurde in TBE-Puffer aufgeköcht und nach Abkühlung auf etwa 60°C in den horizontalen Gelträger gegossen. Nach Erstarren wurde das Gel mit dem Laufpuffer TBE überschichtet und die mit GEBS verdünnten Proben sowie als Größenvergleich ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V. Zur Visualisierung wurde das Gel für 10 bis 30 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (0,7 µg EtBr/ml destilliertes Wasser) gefärbt und anschließend unter UV-Bestrahlung ausgewertet.

2.2.3.2.7 Extraktion des geschnittenen pCANTAB6 Vektors aus einem Agarosegel mit Glasmilchbeads

Der nach *SfiI* und *NotI*-Verdau geschnittene pCANTAB6 Vektor (4,4 kb) wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit einem Skalpell aus dem 1%igen Agarosegel herausgeschnitten und nach Herstellerangaben mit dem Jetsorb Gel Extraktions Kit aus dem ausgeschnittenen Gelblock extrahiert. Bei diesem Verfahren wurde die DNA aus dem Gelblock herausgelöst und an Glasmilchbeads gebunden. Die Beads wurden durch Zentrifugation abgetrennt und mehrmals gewaschen. Mit 20 µl TE-Puffer wurde die DNA wieder von den Beads eluiert. Bei diesem Aufreinigungsverfahren kommt es zu einem etwa 50%igen Verlust. Daher wurden von den ursprünglich eingesetzten 2 µg des Vektors ca. 1 µg für die anschließende Ligation verwendet.

2.2.3.2.8 Ligation der scFv-Inserts mit dem Phagemid Vektor pCANTAB6

Zur Ligation des scFv-Inserts in den Phagemid Vektor pCANTAB6 wurden zunächst je Ansatz etwa 150 ng geschnittener Vektor mit etwa 150 ng geschnittenen Insert zusammen alkoholgefällt (vgl. 2.2.3.2.3). Die gefällte DNA wurde in 86 µl destilliertem Wasser aufgenommen, je 10 µl 10x T4-Ligase-Puffer und 4 µl T4-Ligase (400 U/µl) hinzugefügt. Die Ligationsansätze wurden über Nacht (16 Stunden) bei 4°C inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 70°C hitzeinaktiviert. Vor Elektrotransformation in die Bakterien wurde die DNA mit Phenol-Chloroform extrahiert und in 10 µl destilliertem Wasser aufgenommen (vgl. 2.2.3.2.2). Um die Qualität der späteren Transformation einschätzen zu können, wurde geschnittener Vektor ohne Insert-Zugabe ligiert (Mock-Kontrolle).

2.2.3.2.9 Elektrotransformation der in pCANTAB6 umklonierten scFvs in *E.coli*

Der zur DNA-Aufnahme nahezu inkompetente *E.coli* Bakterienstamm HB2151 wurde durch ein spezielles Präparationsverfahren, durch das die Zellwand der Bakterien modifiziert wird, für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht. Dazu wurde das Wachstum der Bakterien in der logarithmischen Phase unterbrochen, die Bakterien mit 1 mM HEPES-Puffer pH 7,0 und 10% Glycerin gewaschen und anschließend im flüssigen Stickstoff (-195°C) schockgefroren. Eine Testtransformation ergab eine Kompetenz von $1,8 \times 10^7$ pfu/µg.

Die Elektrotransformation erfolgte nach der von Dower *et al.* (1988) beschriebenen Methode auf Eis in vorgekühlten Reaktionsgefäßen. Je 40 µl der elektrokompenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und zu 10 µl vorgekühlter DNA gegeben. Diese Mischung wurde für 2 Minuten bei 4°C inkubiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einem Widerstand von 400 Ω, einer Spannung von 2,5 kV und bei einer Kapazität von 25 µF. Danach wurden die Ansätze sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Nach Herstellung von Verdünnungen wurden die Bakterien auf kleinen Platten mit TYE + Amp + Gluc ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Einzelne Kolonien wurden in 2x TY + Amp + Gluc überführt und nach Kultur bei 37°C auf erfolgreiche Umklonierung überprüft.

2.2.3.2.10 Überprüfung der erfolgreichen Umklonierung

Um die Umklonierung der scFvs Inserts der Klone B3, E10, H10 und F11 in den Phagemid Vektor pCANTAB6 zu überprüfen, wurden je 10 µl der *E.coli* Bakterien HB2151 für 5 Minuten aufgeköcht und bei 13 000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde für die PCR eingesetzt. Um das Vorhandensein des scFv-Inserts mit einer Länge von etwa 700 bp zu

überprüfen, wurden 10 µl PCR-Produkt mit 10 µl GEBS gemischt und auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.3.2.6). Weitere 10 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl Neb 2 Puffer, 0,2 µl BSA, 7,7 µl Aqua dest. und 0,1 µl *Bst*NI gemischt. Dieses Gemisch wurde für 60 Minuten bei 60°C inkubiert und der Verdau durch Zugabe von 5 µl GEBS abgestoppt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 3%igen Agarosegel wurden die Restriktionsmuster analysiert (vgl. 2.2.3.2.6).

2.2.3.3 Aufreinigung der MS C5-spezifischen scFvs

Die MS C5-spezifischen scFvs wurden nach Ankonzentrierung über Metalchelate-Chromatographie mit anschließender Gelfiltration oder über Affinitätschromatographie an Protein L aufgereinigt. Für die Metalchelate-Chromatographie war ein Umklonieren in den Vektor pCANTAB6 erforderlich, damit die exprimierten scFvs einen Rest aus 6 Histidinen am C-Terminus erhielten.

2.2.3.3.1 Ankonzentrierung löslicher scFvs

Die Expression löslicher scFvs wurde durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zu einer 1l-Kultur eines Klones im *E.coli* Bakterien Stamm HB2151 im Medium 2x TY + Amp + Gluc bei einer OD_{600} von 0,9 gestartet und über Nacht (16 Stunden) bei 30°C fortgeführt. Anschließend wurden die Bakterien bei 11325 g, 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 2 Schritten bei 4°C durch ein Membranfiltrationsverfahren (Pro Vario-3) auf das 20fache ankonzentriert. Zunächst wurde der Überstand durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,16 µm filtriert. Dieses Filtrat wurde anschließend durch Filtration über eine weitere Membran (Porengröße 10 kD) von einem Liter auf 50 ml konzentriert. Bei diesem Ankonzentrationsschritt tritt ein Teil des Überstandes und Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 10 kD über die Membran aus. Die scFvs mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kD werden zurückgehalten und durch ständige Volumenreduktion ankonzentriert.

2.2.3.3.2 Aufreinigung löslicher scFvs über Metallchelate-Chromatographie und Gelfiltration

Für die Metallchelate-Chromatographie nach Porath *et al.* (1975) wurden 50 ml ankonzentrierte, lösliche scFvs aus dem Vektor pCANTAB6 mit 5 mM Imidazol versetzt. Die Aufreinigung erfolgte bei 4°C über eine mit Ni^{2+} beladene HiTrap®-Säule. Nach Äquilibrieren der Säule mit Startpuffer (10 mM Imidazol) wurden die ankonzentrierten scFvs mit einer Laufgeschwindigkeit von 2 ml/min auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 50 ml Startpuffer

gewaschen und die gebundenen scFvs mit 20 ml Elutionspuffer (300 mM Imidazol) bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden dann durch Gelfiltration über die Superdex Säule aufgereinigt. Die an das FPLC System angeschlossene Superdex Säule wurde mit 2 Säulenvolumen 160 mM PBS bei einer Flussrate von 4 ml/min äquilibriert. Anschließend wurden 15 ml der Elutionsfraktionen nach Metallchelate-Chromatographie mit 1 ml/min auf die Säule geladen. Nach Waschen der Säule mit 180 ml 160 mM PBS (5 ml/min) wurden die scFvs mit 70 ml 160 mM PBS bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Elutionsfraktionen wurden in der SDS-PAGE mit einem 12%igen Trenngel analysiert (vgl. 2.2.1.1) und Fraktionen mit einer Bande bei etwa 30 kD wurden gepoolt. Die Lösung wurde mittels Ultrazentrifugation in Centriprep Röhrchen 20- bis 30fach ankonzentriert und entsalzt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode (vgl. 2.2.1.3) wurden die scFvs bei -20°C gelagert.

2.2.3.3.3 Aufreinigung solubler scFvs über Affinitätschromatographie an Protein L

Für die Affinitätschromatographie wurden 1 ml Säulen mit 300 mg Protein L gekoppelt an CNBr-aktivierte Sepharose verwendet. Die Säulen wurden mit PBS äquilibriert und 10 ml einer 1:2 Verdünnung von ankonzentrierten scFvs in PBS wurden insgesamt 4mal in einem Kreislauf mit einer peristaltischen Pumpe über die Säule gegeben. Nach Waschen der Säule mit 5 ml PBS wurden gebundene scFvs mit 3 ml 0,1 M Glycin/HCl pH 2,5 eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Durch Zugabe von 1 M Phosphatpuffer pH 8,0 wurden die Elutionsfraktionen sofort neutralisiert und die Protein L-Bindung im Dot Blot und in der SDS-PAGE analysiert.

2.2.3.3.3.1. Analyse der Protein L-Bindung

Nach Aufreinigung der solublen scFvs über Protein L wurden die Elutionsfraktionen auf eine Nitrocellulosemembran gedottet. Die Membran wurde mit 5% Magermilchpulver in TBS (5% M-TBS) mindestens 30 Minuten lang blockiert und anschließend 1,5 Stunden mit dem mAk 9E10 (1:1000 verdünnt in 1% M-TBS) inkubiert, der das c-Myc-Peptid zu detektiert, das an den C-Terminus der V_L -Kette der scFvs fusioniert ist. Nach 3-maligen Waschen der Membran mit TBS wurde ein Peroxidase-konjugierter Ziege anti-Maus IgG Antikörper, 1:1000 verdünnt in 1% M-TBS für 1 Stunde zugegeben. Anschließend wurde der Dot Blot durch Zugabe der 4-Chloro-1-naphthol-haltigen Substratlösung entwickelt.

Fraktionen, die aufgrund des Dot Blots scFvs enthielten, wurden in der SDS-PAGE mit 12%igem Trenngel auf ihre Reinheit hin untersucht (vgl. 2.2.1.1). Die Elutionsfraktionen, die eine einzige Bande bei etwa 30 kD aufwiesen, wurden gepoolt und nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode (vgl. 2.2.1.3) bei -20°C gelagert.

2.2.3.4 Affinitätsbestimmung der scFvs

Um die Bindungsaffinitäten der scFvs zu bestimmen, wurden die Assoziations- (k_a) und Dissoziationsraten (k_d) mit einem Biosensorsystem der Firma BIAcore bestimmt. Das BIAcoresystem bietet die Möglichkeit, die Bindung von Molekülen in Echtzeit zu verfolgen. Dafür wird ein Bindungspartner (Ligand) an die Oberfläche eines Sensorchips gekoppelt. Der zweite Bindungspartner (Analyt) wird dann in einem Flüssigkeitsstrom am gekoppelten Molekül vorbeigeführt und kann an den Liganden binden (Assoziation). Im gleichen Experiment kann auf dieselbe Art der Zerfall des Komplexes (Dissoziation) gemessen werden, indem an der Sensorchipoberfläche Puffer vorbeigeleitet wird, in den die gebundenen Analyten „hineindissoziieren“.

Die Messung basiert auf dem physikalischen Phänomen der **S**urface **P**lasmon **R**esonanz (SPR). Das Messprinzip ist in Abb. 5 schematisch dargestellt. Trifft polarisiertes Licht auf eine mit Gold bedampfte Glasoberfläche, wird ein Teil des Lichtes in Abhängigkeit vom Brechungsindex der Oberfläche in einem bestimmten Winkel reflektiert. Dabei wird das Licht aufgefächert und die Intensität des reflektierten Lichtes inhomogen verteilt. Beim Auftreffen des „Lichtfächers“ auf eine Detektionseinheit wird die Position der geringsten Lichtintensität als Signal registriert (Intensity I). Trifft das polarisierte Licht auf eine Oberfläche mit einem veränderten Brechungsindex, so verändert sich der Reflexionswinkel. Auf der dem Licht abgewandten Seite ist der Ligand (in der Abb. 5 ein Antikörper) an den Sensorchip gekoppelt. Binden Analyten (in Abb. 5 Antigenmoleküle) an den Liganden, so nimmt die Masse des an den Sensorchip gekoppelten Komplexes zu. Diese Massenzunahme wiederum führt zu einer Veränderung des Brechungsindex der Glas-Goldschicht. Dadurch wird das polarisierte Licht in einem veränderten Winkel reflektiert (Intensity II). Diese „Ablenkung“ des Signals wird ebenfalls von der Detektionseinheit registriert und als Response Units (RU) in Abhängigkeit von der Zeit in einem Sensorgramm dargestellt. D.h. das Sensorgramm zeigt den Fortgang der Interaktion an der Chipoberfläche an.

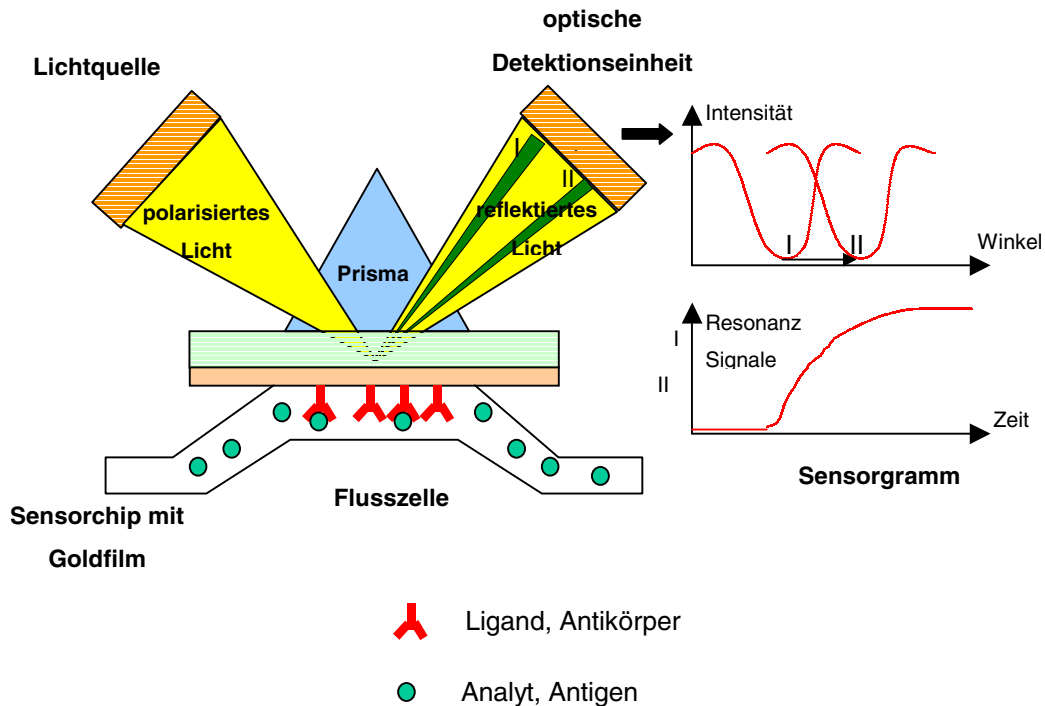


Abb. 5. Funktionsprinzip einer BIAcore Messung.

In Anlehnung an BIAcore Homepage <http://www.biocore.com/biomol/basics/realtime.html> 13.10.2000.

Da die Messwerte nur auf einer Massenänderung beruhen, ist diese Technik für die Analyse von molekularen Interaktionen, wie z.B. zwischen Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren und Lipiden, geeignet. Außerdem ist die Technik unabhängig von Molekülgrößen, -ladungen oder anderen chemischen oder physikalischen Faktoren, wenn eine Mindestgröße der Reaktionspartner von ca. 1000 Dalton nicht unterschritten wird.

Die Kopplung des Liganden an den Sensorchip kann mit verschiedenen Methoden erfolgen. Für die Kopplung biotinylierter Moleküle stehen Streptavidin beschichtete Chips zur Verfügung, Moleküle mit Histidin-Tags können über eine Chelatbindung mit Metallionen auf einer NTA-Oberfläche (NTA: nitriloacetic acid) an den Chip gekoppelt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die kovalente Bindung des Liganden an die Carboxylatgruppen von Dextranmolekülen auf der Chipoberfläche. Hierfür können 4 verschiedene chemische Reaktionen eingesetzt werden: 1. Kopplung über Amine des Liganden mit Hilfe von aktivierten Estern, 2. Kopplung über ein aktiviertes Disulfid des Liganden, 3. Kopplung über ein aktiviertes Disulfid auf der Chipoberfläche und 4. Kopplung über Aldehydgruppen des Liganden.

In dieser Arbeit wurden als Ligand die aufgereinigten scFVs über primäre Amine kovalent an den Sensorchip CM5 gekoppelt. Hierfür wurde der Amin-Kopplungs-Kit des Herstellers eingesetzt und eine Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt. Zunächst wurde die Chipoberfläche durch Bindung aktiver Estergruppen (N-hydroxysuccinimidester) an die Carboxylatgruppen aktiviert. Dazu wurde eine 1:1 Mischung aus 200 mM N-ethyl-N'(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 50 μM N-hydroxysuccinimid (NHS) für 7 Minuten über die Oberfläche geleitet. Dann wurden die aufgereinigten scFVs an den Chip gekoppelt, indem eine Lösung mit 10 μg scFVs/ml Na-acetat, pH 4,8 bis Erreichen von 50 bis 400 Response Units (RU) über den Chip gegeben wurden. Anschließend wurde die Chipoberfläche deaktiviert, d.h. nicht kovalent gebundene Moleküle wurden durch Lösungen mit hoher Ionenstärke von der Oberfläche entfernt und nicht abreagierte Ester wurden durch Kopplung von Aminen abgesättigt. Hierfür wurde eine Lösung von 1 M Ethanolamin/HCl, pH 8,5 injiziert.

Als Analyt wurden unterschiedliche MS C5-Konzentrationen mindestens zweimal mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den Chip gegeben. Nach Kopplung der scFVs B3 wurden 1, 10, 25, 75 und 100 μg MS C5/ml eingesetzt. Für die Affinitätsbestimmung der scFVs des Klonen E10 wurden 1, 10, 50 und 100 μg MS C5/ml verwendet. Im Falle des Klonen H10 wurde MS C5 in den Konzentrationen 25, 50, 75 und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Zwischen den einzelnen Messungen wurde der Chip durch eine 1-minütige Injektion von 5 mM NaOH regeneriert, d.h. die Bindung des Analyten MS C5 an den Liganden scFv wurde durch eine Änderung des pH-Wertes zerstört.

Aus den gemessenen Daten wurden mit Hilfe der BIAevaluations Software 3.0 die Assoziationsraten (k_a) und Dissoziationsraten (k_d) jeder Messung bestimmt. Die Assoziationsrate k_a [$\text{Mol}^{-1}\text{s}^{-1}$] gibt die Geschwindigkeit der Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes wieder. Die Geschwindigkeit, mit der der Komplex wieder zerfällt, wird mit der Dissoziationskonstanten k_d [s^{-1}] wiedergegeben.



Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, gilt: $k_a [A] [B] = k_d [AB]$.

Daraus ergibt sich die Gleichgewichtskonstante für die Dissoziation mit der Einheit Mol:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A] [B]}{[AB]}$$

2.2.3.5 Analyse der Inhibition des Komplementsystems durch scFvs

Zur Überprüfung der Fähigkeit der aufgereinigten anti-MS C5 scFvs, die C5-Spaltung bei Aktivierung des Komplementsystems zu inhibieren, wurde zunächst im hämolytischen Test (vgl. 2.2.2.3) die Menge an MS Serum (Pool aus 4 C2BB/R+ MS) bestimmt, welche eine 50%ige Hämolyse der eingesetzten sensibilisierten Schafserythrozyten verursacht (CH50-Einheit). Eine CH50-Einheit entsprach 20,5 µl einer 1:30 Verdünnung eines MS Serums in VBS++ Puffer. Diese Menge Serum wurde für 30 Minuten bei 37°C mit je 10 µl unterschiedlichen Verdünnungen von scFvs in VBS++ Puffer inkubiert und dann im hämolytischen Test eingesetzt. Entsprechend des höheren Volumens an mit scFvs versetztem Serum, wurde die Menge an eiskalter Kochsalzlösung zum Abstoppen der Reaktion reduziert. Anschließend wurde die prozentuale Lyse ermittelt, wobei als Bezugsgröße die von mit VBS++Puffer an Stelle von scFvs vorinkubiertem MS Serum erzeugte Hämolyse diente.

2.2.3.6 Nachweis von MS C5 mittels BIAcore

Zur Bestimmung von C5 Konzentrationen wurden die aufgereinigten MS C5-spezifischen scFvs des Klones E10 nach Herstellerangaben kovalent an die Oberfläche eines CM5 Sensorchips gekoppelt, bis 3500 Response Units erreicht waren (vgl. 2.2.3.4). Anschließend wurde aufgereinigtes MS C5 in unterschiedlichen Konzentrationen (100, 250, 500 ng/ml, 1, 2, 4, 8 und 10 µg/ml in normalem humanem Serum) je zweimal für die Dauer von 140 Sekunden mit einer Flussrate von 5µl/min über den Chip gegeben. Um eine Standardkurve zu erhalten, wurden die durchschnittlichen, gemessenen Response Units gegen die MS C5 Konzentration aufgetragen. Unter denselben Bedingungen wurden die Response Units von verschiedenen MS Serumkonzentrationen (Pool aus 3 C2BB/R+ MS; 1:200, 1:100, 1:50 und 1:25 verdünnt) je dreimal gemessen und die durchschnittliche C5 Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.

2.2.4 Zellkultur der eukaryonten Zelllinien JH4 und YAC-1 sowie der Hybridomzelllinie 3.2.3

Die verwendeten Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C und, sofern nicht anders vermerkt, in Gegenwart von humidifizierter 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Die adhärente MS Zelllinie JH4 wurde im Medium Nutrient Mixture F12-K, Kaighn's Modification, ergänzt mit 10% FCS, kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert (alle 5 bis 7 Tage). Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA abgelöst. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch das im Medium

enthaltene FCS. Für die Gewinnung von Membranextrakten (vgl. 2.2.6.1) wurden die JH4 Zellen mit einer Cell-dissociation Lösung auf nicht enzymatischer Basis abgelöst, um eine Degradation der Proteine zu vermeiden.

Die Hybridomzelllinie 3.2.3 wurde als Suspensionszelle zunächst im Medium RPMI 1640, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 IU/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin, kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz (bei 10% FCS nach etwa 3 bis 4 Tagen) wurden die Zellen passagiert und dabei die FCS-Konzentration im Medium stufenweise auf 2,5% erniedrigt, was eine Verlängerung der Zeitspanne bis zur Konfluenz auf 5 bis 7 Tage bewirkte. Zur Gewinnung des von der Zelllinie produzierten anti-Ratten Natürliche Killerzellen Antikörpers (mAk 3.2.3) wurden die Zellen bei 200 g abzentrifugiert und der Überstand bis zur Aufreinigung über Protein G bei -20°C gelagert (vgl. 2.2.7.1).

YAC-1 Zellen wurden als Suspensionszellen im Medium DMEM, ergänzt mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 IU/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin, in Gegenwart von 10% humifizierter CO₂-Atmosphäre kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz (nach etwa 2 bis 3 Tagen) wurden die Zellen passagiert. Zum Einsatz für den Chromfreisetzungstest zum Nachweis der Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen (vgl.2.2.7.3) wurden die Zellen vor Erreichen der Konfluenz zweimal mit TC199 gewaschen und in dem Medium TC199 aufgenommen.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspension mit 0,5%iger Trypanblau-Lösung durchgeführt.

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte durch Lagerung in Einfriermedium (Medium mit 20% FCS und 10% DMSO) bei -195°C in flüssigem Stickstoff.

2.2.5 Gewinnung von Material aus MS, Maus und Ratte

Nach Betäubung oder Tötung der Tiere wurden einzelne Bestandteile des Blutes wie Serum, Leukozyten, mononukleäre Zellen oder Thrombozyten isoliert. Das Serum wurde zur Analyse der Komplementaktivität im hämolytischen Test (vgl. 2.2.2.3) oder der xenoreaktiven natürlichen Antikörper (XNA, vgl. 2.2.6) eingesetzt. Zur Analyse der Natürlichen Killerzellen oder der B-Zellen wurden die Leukozyten oder die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PMBC) verwendet (vgl. 2.2.7). Thrombozyten aber auch Milz- und Leberzellen dienten der Antigengewinnung zur XNA Analyse. MS Leberzellen wurden außerdem für die intraportale Infusion bei Ratten eingesetzt (vgl. 2.2.8.5).

2.2.5.1 Narkotisierung und Tötung der Tiere

Die Betäubung der Ratten und Mäuse erfolgte durch Inhalationsnarkose mit Diethylether. MS wurden durch die intramuskuläre Verabreichung einer Kombination aus 80 mg Ketamin pro kg Körpergewicht und 2 mg Rompun pro kg Körpergewicht betäubt. Zur Tötung wurden die Tiere in einen mit CO₂ gefüllten Exsikkator gesetzt, bis keine Atmung und kein Herzschlag mehr festzustellen war. Anschließend erfolgte eine Thoraxöffnung und die Organe wurden entnommen.

2.2.5.2 Organentnahme

Blutproben bis etwa 1 ml wurden durch Punktion am Augenhintergrund der narkotisierten Tiere entnommen. Größere Blutmengen wurden durch Herzpunktion gewonnen. Falls erforderlich, enthielten die Blutentnahmegefäße zur Gerinnungshemmung Acid-Citrat-Dextrose (1 ml ACD für 10 ml Blut, ACD-Blut).

Andere Organe, wie Milz oder Leber, wurden den kurz vorher getöteten Tieren unter aseptischen Bedingungen entnommen.

2.2.5.3 Gewinnung von Serum oder Leukozyten aus peripherem Blut

Um Serum zu gewinnen, wurden frische Blutproben nach einer 30-minütigen Gerinnung bei 2000 g, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und bei –70°C gelagert.

Zur Gewinnung von Leukozyten aus peripherem Blut wurden die Erythrozyten in 1 Volumen ACD-Blut durch Zugabe von 9 Volumina eiskaltem Erythrozyten-Lysereagenz lysiert. Nach Unterschichten mit FCS wurden die Leukozyten bei 200 g für 10 Minuten abzentrifugiert und zur Absorption der B-Zellen in PBS mit 5% FCS oder zur Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) in PBS oder im Medium TC199 aufgenommen. Wurden die Leukozyten direkt für die Bestimmung der NK- oder B-Zellen in der Durchflußzytometrie oder den Chromfreisetzungstest verwendet, wurden die Zellen zweimal mit Zellkulturmedium RPMI1640 oder TC199 gewaschen (vgl. 2.2.7).

2.2.5.4 Absorption von B-Zellen aus den Leukozyten mittels Nylonwatte

Um die B-Zellen von den übrigen Leukozyten abzutrennen, wurden 1,4 g Nylonwatte sehr fein zerrupft und in einer 10 ml Leersäule auf ein Volumen von 6 ml zusammengestopft. Alle verwendeten Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt. Nach Waschen der Säule mit 50 ml PBS wurden 10 ml PBS ergänzt mit 5% FCS eingespült und die Säule mindestens 60 Minuten bei

37°C inkubiert. Danach wurde die Säule mit weiteren 50 ml PBS/ % FCS gespült und die aus ACD-Blut isolierten Leukozyten tropfenweise auf die Säule gegeben, mit 2 ml PBS ergänzt mit 5% FCS eingespült und die Säule bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Durch tropfenweise Zugabe von PBS wurden die nicht adhärenen Zellen (T-Zellen, Monozyten, Granulozyten) herausgespült.

2.2.5.5 Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Um die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC; Lymphozyten und Monozyten) zu isolieren, wurden die aus ACD-Blut isolierten Leukozyten in etwa 1 ml Medium TC199 oder PBS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde vorsichtig über 8 ml Percoll[®] mit einer Dichte von 1,086 g/ml in einem 12 ml PE-Röhrchen geschichtet und bei 400 g für 30 Minuten zentrifugiert (ohne Bremse). Die Zellen an der Grenzschicht zum Percoll[®] wurden abgenommen und zweimal im 5fachen Volumen PBS oder Medium TC199 gewaschen (200 g, 10 Minuten).

2.2.5.6 Präparation von MS Thrombozyten

Thrombozyten wurden aus ACD Blut eines C2BB/R+ MS gewonnen (Köhl, 1997). Nach Zentrifugation des Blutes bei 185 g für 20 Minuten in 12 ml PE-Röhrchen wurde das plättchenreiche Plasma (PRP) sorgfältig vom Zellpellet (Erythrozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) abgenommen und mit ACD auf einen pH von 6,5 eingestellt (1,33 ml ACD pro 10 ml PRP). Die Thrombozyten wurden durch Zentrifugation bei 1400 g, 10 Minuten pelletiert und zweimal mit Puffer D gewaschen. Anschließend wurden die Thrombozyten in PBS aufgenommen und zur Gewinnung von Membranextrakten verwendet.

2.2.5.7 Präparation von MS Leber- und Milzzellen

Zur Herstellung von Membranextrakten als Antigen für die Analyse von xenoreaktiven Antikörpern (vgl. 2.2.6.1) wurden die Leber- und Milzzellen eines C2BB/R+ MS präpariert. Direkt nach der Entnahme wurden die Organe in sterile Petrischalen mit kaltem PBS überführt. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Organe wurden kleingeschnitten und durch ein steriles Metallsieb gedrückt. Nach Zentrifugation (200 g, 10 Minuten) wurden die Zellen zweimal gewaschen und in kaltem PBS aufgenommen.

Die für die intraportale Infusion verwendeten Leberzellen von C2BB/R+ oder Dunkin Hartley MS wurden analog präpariert und zur zusätzlichen Homogenisierung zweimal in sterile Spritzen durch Kanülen mit abnehmenden Durchmesser (Gr. 1 und Gr. 2) aufgenommen (vgl. 2.2.9.6).

2.2.6 Analyse von xenoreaktiven natürlichen Antikörpern (XNA)

Zum Nachweis von natürlichen xenoreaktiven, gegen MS gerichteten Antikörpern (XNA) aus Rattenserum wurden Membranextrakte aus MS Thrombozyten, Leber- und Milzzellen sowie der JH 4 Zelllinie präpariert und als Antigene im ELISA und im Immunblot eingesetzt.

2.2.6.1 Herstellung von Membranextrakten als Antigen für den Nachweis von XNA

Nach der von Leventhal *et al.* (1992b) beschriebenen Methode wurden aus Thrombozyten, Leber- und Milzzellen eines C2BB/R+ MS sowie der JH4 Zelllinie Membranextrakte hergestellt. Die unterschiedlichen Zelltypen wurden durch den dreimaligen Wechsel von Einfrieren in Flüssig-Stickstoff (-195°C) und Auftauen bei 37°C lysiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 1200 g für 10 Minuten wurden die Überstände mit dem gleichen Volumen Extraktionspuffer über Nacht unter Rotation inkubiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei 200 000 g, für 30 Minuten entfernt. Nach Bestimmung des Proteingehaltes nach der BCA-Methode (vgl. 2.2.1.3) wurden die klaren Überstände bei -70°C gelagert.

2.2.6.2 Nachweis von XNA im ELISA (XNA-ELISA)

Die Bestimmung von XNA erfolgte in Anlehnung an einen von Leventhal *et al.* (1992b) beschriebenen ELISA gegen MS Thrombozytenmembranen. Alle Inkubationsschritte wurden, sofern nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur und in einem Volumen von 100 µl pro Vertiefung in einer Mikrotiterplatte mit Rundboden durchgeführt. Nach jeder Inkubation wurde die Platte mit TBS-Waschpuffer für den XNA-ELISA oder dem angegebenen Puffer gewaschen.

Die Membranextrakte der MS-Zellen wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml über Nacht (16 Stunden) bei 37°C an die Platte angelagert. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation mit 200 µl pro Vertiefung 1% BSA in TBS für 2 Stunden. Danach wurden serielle Verdünnungen von Rattenserum in 1% BSA in TBS zugegeben und für 2,5 Stunden inkubiert. Gebundene, gegen MS Antigen gerichtete Antikörper wurden durch 90-minütige Inkubation mit alkalischer Phosphatase konjugierten Sekundärantikörpern Kaninchen anti-Ratte IgM (1:100 in TBS) bzw. Schaf anti-Ratte IgG (1:500 in TBS) detektiert. Die Platten wurden dreimal mit TBS Waschpuffer für XNA-ELISA und einmal mit 10 mM DEA gewaschen. Als Substrat für das Enzym Phosphatase wurden 1 mg/ml PNPP/5 mM MgCl₂ in 10 mM DEA zugefügt und nach 60 Minuten die OD bei 405 nm bestimmt. Als Negativkontrolle wurde Serum von C2BB/R+ MS an Stelle von Rattenserum verwendet und der gemessene OD-Wert von den im Doppelwert bestimmten Werten der Rattenserum abgezogen.

Zur Ermittlung der Reduktion oder des Anstieges von XNA bei einem Individuum wurden die OD-Werte der 1:2 Serumverdünnungen ausgewertet. Die ermittelten Signale wurden prozentual auf den von diesem Individuum vor jeglicher Behandlung erzielten Wert bezogen.

2.2.6.3 Immunblot zum Nachweis von MS Antigenen durch Rattenserum

Zur Analyse der von Rattenserum erkannten MS Antigene wurden die Membranextrakte gelelektrophoretisch in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot nachgewiesen.

2.2.6.3.1 Western Blot der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine

Je 15 µg der MS Membranextrakte wurden in der SDS-PAGE in einem 7,5 %igem Trenngel aufgetrennt (vgl. 2.2.1.1). Nach beendeter Gelelektrophorese wurden das Gel und ein etwas größeres Stück Nitrocellulose mit Transferpuffer angefeuchtet und übereinander luftblasenfrei zwischen je 2 Whatman Filterpapieren, ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtet, so in die Westernblot Transferkammer eingelegt, dass die Nitrocellulose zwischen Gel und Anode der Kammer lag. Für den elektrischen Transfer der Proteine wurde eine Stromstärke von 2 mA/cm² für die Dauer von 60 Minuten gewählt.

Zur Kontrolle des Transfers wurden nach Entfernung der Markerbande die Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit Ponceau-S-Lösung angefärbt, in einzelne 4 mm breite Streifen (15 µg Protein) geschnitten und anschließend mit destilliertem Wasser wieder entfärbt.

2.2.6.3.2 Immunblot

Die 4 mm breiten Nitrocellulosestreifen mit je 15 µg MS Membranextrakt wurden mit 3% BSA in TBS Waschpuffer für Immunblot für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden in einem Volumen von 250 µl pro Streifen, und, sofern nicht anders vermerkt, mit 1 % BSA in TBS Waschpuffer für Immunblot unter Schütteln durchgeführt. Zwischen den Inkubationen wurde jeder Streifen dreimal 10 Minuten in 5 ml TBS Waschpuffer für Immunblot bei Raumtemperatur ebenfalls unter Schütteln gewaschen.

Nach der Blockierung wurden die Streifen mit einer 1:100 oder 1:200 Verdünnung von Rattenserum über Nacht (16 Stunden) bei 4°C inkubiert. Die gebundenen, gegen MS Antigene gerichteten Antikörper aus dem Rattenserum wurden mit alkalischer Phosphatase konjugierten Schaf anti-Ratte IgG (1:500 in TBS) bzw. Kaninchen anti-Ratte IgM (1:100 in TBS) durch 2-stündige Inkubation detektiert. Nach Waschen der Streifen wurden die von Ratten IgG bzw. IgM erkannten Banden der MS Membranextrakte durch Farbreaktion mit BCIP/NBT Substratlösung sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle wurde 1% BSA in TBS Waschpuffer für Immunblot anstelle von Rattenserum verwendet.

2.2.7 Analyse von B-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen von Ratten wurden nach Fluoreszenz-Markierung über einen monoklonalen anti-Ratten NK-Zellen Antikörper (mAk 3.2.3) in der Durchflußzytometrie analysiert. In einem Chromfreisetzungstest wurde die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber Maus-Myelomzellen (YAC-1) und Concanavalin A-stimulierten Milzzellen von Maus und MS bestimmt.

Die Analyse von B-Zellen erfolgte nach Fluoreszenzmarkierung der CD45RA- und der CD5-Antigene ebenfalls in der Durchflußzytometrie.

2.2.7.1 Aufreinigung des Maus anti-Ratte NK-Zellen Antikörpers (mAk 3.2.3)

Der von der Hybridomzelle 3.2.3 in den Überstand produzierte, gegen Ratten NK-Zellen gerichtete mAk 3.2.3 wurde über Protein G mittels FPLC (**F**ast **P**rotein **L**iquid **C**hromatography) aufgereinigt. Verwendet wurde Zellkulturüberstand, der durch Zusatz von 2,5 % FCS in das Kulturmedium entstanden war. Die Protein G Säule wurde mit 4 Säulenvolumen Startpuffer äquilibriert und anschließend der sterilt gefilterte (0,8 µm) Zellkulturüberstand mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit etwa 10 Säulenvolumen Startpuffer wurde der mAk mit dem Elutionspuffer eluiert (1 ml/min) und in Fraktionen à 1 ml gesammelt. Durch Zugabe von 1 M Tris/HCl pH 9,0 wurden die Elutionsfraktionen neutralisiert. Fraktionen, die im SDS-PAGE mit 12%igem Trenngel mit anschließender Silberfärbung 2 Banden von etwa 60 und 30 kD aufwiesen, wurden gepoolt und nach Proteinbestimmung nach der BCA Methode mit IgG Standard (vgl. 2.2.1) bei -20°C gelagert. Mit dieser Methode konnten aus 600 ml Zellkulturüberstand 1,14 g reiner Antikörper gewonnen werden.

2.2.7.2 Durchflußzytometrische Bestimmung von NK-Zellen und B-Zellen

Um NK-Zellen oder B-Zellen innerhalb der Leukozyten, der mononukleären Zellen im peripheren Blut (PBMC) oder der für den Chromfreisetzungstest eingesetzten Effektorzellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und im Durchflußzytometer FACScan™ analysiert. Die Färbung der Zellen erfolgte bei 4°C in Mikrotiterplatten mit Rundboden, die mit Hilfe von Polyacetatklebefolie, sog. „plate-sealers“, dicht verschlossen wurden.

Zur Färbung der NK-Zellen wurden die in 100 µl peripherem ACD-Blut enthaltenen Leukozyten oder PMBCs bzw. $2,5 \times 10^5$ der für den Chromfreisetzungstest eingesetzten Effektorzellen mit je 100 µl einer 1:1000 Verdünnung von aufgereinigtem mAk 3.2.3 in PBS mit 1% BSA für 60 Minuten inkubiert. Als Negativkontrolle für unspezifische Bindung wurden die Zellen parallel mit 1% BSA in PBS und als IgG1-Isotypkontrolle mit mAk 1224 (gegen humanes C3 und C3a gerichtet, Klos *et al.* 1988) in der gleichen Konzentration wie der mAk 3.2.3 inkubiert. Nach

zweimaligem Waschen mit PBS (600 µl, 5 Minuten) wurden die Zellen mit je 100 µl des FITC-gelabeltem Ziege anti-Maus Ig Antikörpers (1:100 verdünnt in PBS mit 1% BSA) 30 Minuten lang inkubiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers Ziege anti-Maus Ig wurde dieser vor Verdünnung 10 Minuten mit dem gleichen Volumen Rattenserum abgeblockt. Nach 3 weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 150 µl kaltem PBS mit 1% Formamid resuspendiert und durchflußzytometrisch analysiert.

Zur Färbung aller B-Zellen und der CD5 positiven B-Zellen wurden die gleichen Zellmengen wie bei der Färbung der NK-Zellen mit 10 µl PE-markiertem Maus anti-Ratte CD45RA und/oder 10 µl FITC-gelabeltem Maus anti-Ratte CD5 IgG Antikörper 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen in 150 µl eiskaltem PBS mit 1% Formamid aufgenommen und im FACScan™ analysiert. Die einfach gefärbten Zellen wurden zur Einstellung der Kompensation am Gerät benutzt, um die „Überstrahlung“, d.h. die zu einem geringen Prozentsatz auch im für die jeweils andere Fluoreszenz verwendeten Detektor erfasste Fluoreszenz, auszugleichen.

Die aus der Fluoreszenzmessung erhaltenen Messdaten wurden mit Hilfe des Software Programmes CellQuest™ gespeichert und mit dieser Software oder WinMDI ausgewertet.

Für die Auswertung der NK-Zellen wurde jeweils die Lymphozytenpopulation ausgewählt („gating“) und die dort erfassten Ereignisse in Abhängigkeit von der Fluoreszenz 1 (FITC) als Histogramm aufgetragen. Im Histogramm wurde der prozentuale Anteil der Ereignisse ausgewertet, die eine positive Fluoreszenz von $>10^{-2}$ aufwiesen.

Zur Auswertung der CD5-positiven B-Zellen wurden ebenfalls die Lymphozyten der Probe ausgewählt. Durch Darstellen der Fluoreszenz 1 oder 2 (FL 1 oder 2) gegen das Vorwärtstreulicht (Forward scatter, FSC) wurde der Anteil der CD5 positiven (FL 1) und der CD45 positiven (FL 2) Zellen ermittelt. Die doppelt positiven Ereignisse (FL 1 und FL 2 positiv) wurden in Abhängigkeit der Fluoreszenz 1 im Histogramm aufgetragen und somit der Anteil der CD5-positiven Zellen an den CD45-positiven Zellen bestimmt.

2.2.7.3 Chromfreisetzungstest zur Bestimmung der Zytotoxizität von Ratten NK-Zellen

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von Ratten NK-Zellen wurden Leukozyten oder periphere mononukleäre Zellen (PMBC) aus Rattenblut als Effektorzellen und mit radioaktivem Chrom markierte Zielzellen, d.h. Mausmyelomzellen (YAC-1) oder Concanavalin A stimulierte Lymphozyten aus Milz von Maus oder MS, kokultiviert. Die Lyse der Zielzellen wurde durch Bestimmung der freigesetzten Radioaktivität ermittelt.

2.2.7.3.1 Präparation von Milzzellen

Die frisch entnommene Milz von C2BB/R- MS oder C57BL/6 Mäusen wurde in Medium TC199 überführt, kleingeschnitten und durch ein steriles Metallsieb gedrückt. Die Zellsuspension wurde bei 200 g für 10 Minuten abzentrifugiert und die Erythrozyten im Pellet durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Eryzyten-Lysereagenz bei 4°C lysiert. Nach Unterschichten mit FCS wurde erneut zentrifugiert und die Zellen zweimal mit dem Medium TC199 gewaschen.

2.2.7.3.2 Stimulation der Proliferation von Lymphozyten durch Concanavalin A

Zur Stimulation der Proliferation von Lymphozyten wurden frisch präparierte Milzzellen unter sterilen Bedingungen im Zellkulturmedium DMEM, ergänzt mit 2 mM L-Glutamin, 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin sowie unterschiedlicher ConcanavalinA- (Con A-) und FCS- Konzentrationen bei 37°C in Gegenwart von 10% CO₂ humifizierter Atmosphäre kultiviert.

Die optimalen Bedingungen, wie Con A-, FCS-Konzentration und Kulturdauer, wurden durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin (³H-Thymidin) jeweils in Dreifachwerten ermittelt. Die Überprüfung im kleinen Maßstab erfolgte durch Kultivierung von je 2,5 x 10⁵ Milzzellen in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit Flachboden in einem Endvolumen von 150 µl. Um die Con A-Stimulation bei Verwendung größerer Zellzahlen zu testen, wurden je 2 x 10⁷ Milzzellen in einer 30 ml Zellkulturflasche stehend kultiviert und 150 µl der Zellsuspension in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit Flachboden überführt. Nach Zugabe von je 50 µl ³H-Thymidin in DMEM (1µCi) wurden die Platten weitere 16 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ in humifizierter Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und auf Glasfaserfilter aufgebracht. Nach Trocknen wurden die Filter in Folie eingeschweißt, mit Szintillisationsflüssigkeit benetzt und die Radioaktivität (Beta-Strahlung) der Zellen einer Vertiefung in cpm vermessen.

Für den Chromfreisetzungstest wurden frisch präparierte Milzzellen unter den ermittelten Bedingungen mit Con A stimuliert, bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert und zur Aufhebung der durch Con A verursachten Konglomeration mit TC199, ergänzt mit 0,05 M Methyl α-D-Mannopyranosid, bei 37°C 15 Minuten inkubiert. Nach zweimaligen Waschen wurden die Zellen im Medium TC199 aufgenommen und zur Markierung mit Chrom eingesetzt.

2.2.7.3.3 Markierung der Zielzellen mit Chrom

Je 3 x 10⁶ Zielzellen, entweder YAC-1 oder mit Con A stimulierte Lymphozyten, wurden mit 100 µCi ⁵¹Chrom bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Nicht aufgenommenes Chrom wurde durch dreimaliges Waschen mit TC199, ergänzt mit 5% FCS, entfernt. Die Zellen wurden anschließend in DMEM, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 IU/ml Penicillin und 50

µg/ml Streptomycin sowie 5% HEPES, in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/100 µl aufgenommen und als Zielzellen für den Chromfreisetzungstest eingesetzt.

2.2.7.3.4 Präparation der Effektorzellen

Als Effektorzellen wurden entweder Leukozyten (vgl. 2.2.5.3) oder mononukleäre Zellen (vgl. 2.2.5.5) aus dem peripheren Blut unter sterilen Bedingungen präpariert und in Zellkulturmedium DMEM, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin sowie 5% HEPES, aufgenommen. Der Anteil der NK-Zellen wurde in der Durchflußzytometrie bestimmt (vgl. 2.2.7.2).

2.2.7.3.5 Chromfreisetzungstest

Der Chromfreisetzungstest wurde unter sterilen Bedingungen unter Verwendung von Kulturmedium DMEM, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 IU/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 5% HEPES, in Mikrotiterplatten mit Rundboden durchgeführt. Pro Vertiefung wurden 50 µl mit 51 Chrom-markierte Zielzellen zu 100 µl Effektorzellen 4 Stunden gegeben, so dass Effektor zu Zielzell-Verhältnisse (E:Z Ratio) von 100:1, 50:1 usw. bis 1,9:1 jeweils in Dreifachwerten entstanden. Zur Ermittlung der spontanen bzw. totalen Lyse der Zielzellen wurden 100 µl Medium bzw. 50 µl Medium und 50 µl 10% wässrige Triton X-100 Lösung jeweils in 6fach Werten zu den Zielzellen gegeben. Die Platten wurden 4 Stunden bei 37°C in 10% CO₂ humidifizierter Atmosphäre inkubiert und bei 200 g für 3 Minuten zentrifugiert. Je 25 µl zellfreier Überstand wurde in die Vertiefung einer PET Mikrotiterplatte mit 100 µl Szintillationsflüssigkeit überführt und die Radioaktivität (Beta-Strahlung) in cpm gemessen. Der Prozentsatz spezifischer Zytotoxizität wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\% \text{ spezifische Zytotoxizität} = \frac{\text{cpm Probe} - \text{cpm spontane Lyse}}{\text{cpm totale Lyse} - \text{cpm spontane Lyse}} \times 100$$

2.2.8 Nachweis von MS oder Ratten C3 mittels RT-PCR

Zum Nachweis von MS oder Ratten C3 wurde die Gesamt-RNA aus frischer Leber oder dem bei der Serumgewinnung anfallendem Blutkuchen isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Mit speziesspezifischen Primern wurde aus der cDNA in einer PCR ein Gensegment aus C3 amplifiziert und im Agarosegel auf seine Größe hin analysiert. Da Hepatozyten und Kupfer'sche Sternzellen C3 synthetisieren, soll mit diesem Verfahren analysiert werden, ob sich MS Leberzellen nach intraportaler Infusion in Ratten absiedeln oder zirkulieren.

2.2.8.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA aus frischer MS- oder Rattenleber bzw. Blutkuchen nach Gewinnung von Rattenserum wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Um einen Verdau der RNA durch RNAsen zu verhindern, wurde während der Präparation unter RNase-freien Bedingungen (separater Arbeitsplatz, nur für RNA-Arbeiten verwendete Materialien und Substanzen) und, sofern nicht anders vermerkt, bei 4°C gearbeitet. Eine frisch entnommene Leber wurde kleingeschnitten, durch ein steriles Metallsieb gedrückt und 3 Stunden in 100 ml Medium RPMI1640 auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 180 g, für 10 Minuten abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet oder der aus etwa 1 ml Blut isolierte Blutkuchen wurde in 1 ml RNA Stammlösung mit 0,1 M 2-Mercaptoethanol vorsichtig resuspendiert und 200 µl 2M Natriumacetat pH 4,0, 2 ml Phenol und 400 µl Chloroform/isoAmylalkohol hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation wurden durch Zentrifugation (10 000 g, 20 Min) die Phasen getrennt. Die in der oberen, wässrigen Phase gelöste RNA wurde von der DNA und Proteine enthaltenden Interphase abgenommen und nach Überführung in ein steriles Rundbodenröhrchen mit dem gleichen Volumen Isopropanol (x ml) gemischt und 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 10 000 g für 20 Minuten präzipitiert und mit einem Zehntel des Volumens x in RNA Stammlösung mit 0,1 M 2-Mercaptoethanol aufgenommen. Nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol wurde die RNA erneut bei -20°C für mindestens 30 Minuten gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation (15 000 g, 10 Min.) pelletiert, mit 75%igem Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Nach Aufnahme der RNA in TE wurde die Konzentration photometrisch bestimmt, die Qualität im Agarosegel überprüft und für die RT-PCR zur Generierung von cDNA eingesetzt.

2.2.8.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von DNA und RNA kann durch Messung der optischen Dichte bestimmt werden (Ausubel *et al.* 1998). Die RNA wurde dazu in einem geeigneten Volumen TE verdünnt und die Extinktion bei den Wellenlängen $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm gegen TE-Puffer gemessen. Eine gemessene OD_{260} von 1,0 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Die Reinheit der Nukleinsäure wurde mit Hilfe des Quotienten von OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Bei einem Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegt die Nukleinsäure in reiner Form vor, liegt er darunter, so ist die RNA nicht vollständig gelöst. Höhere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

2.2.8.3 Überprüfung der isolierten Gesamt-RNA im Agarosegel

Um die Qualität der isolierten Gesamt-RNA zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-Gel durchgeführt.

Je 2 μl der in TE gelösten Gesamt-RNA wurden mit 3 μl RNA-Auftragspuffer versetzt und für 15 Minuten bei 65°C denaturiert. Diese Proben wurden auf ein 1%iges RNA-Agarosegels (1g Agarose in RNA-Laufpuffer mit 0,5 M Formaldehyd) aufgetragen und im Vergleich zu dem RNA-Molekulargewichtsmarker in RNA-Laufpuffer bei 4 V/cm² Gel aufgetrennt. Anschließend wurde durch Betrachtung im UV-Licht die Gesamt-RNA beurteilt.

2.2.8.4 Reverse Transkription zur Generierung von cDNA aus Gesamt-RNA

Zur Generierung von cDNA aus 5 μg Gesamt-RNA wurde eine Reverse Transkription (RT) mittels Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase durchgeführt. Um die Sekundärstrukturen der mRNA aufzubrechen, wurden 5 μg der Gesamt-RNA mit 1 μl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ –Primer (500 $\mu\text{g/ml}$) in einem Endvolumen von 12 μl bei 70°C für 10 Minuten inkubiert und anschließend schnell auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 4 μl 5x First Strand Puffer, 2 μl 0,1 M DTT und 1 μl 10 mM dNTP Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP) wurde die Mischung bei 42°C für 2 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 1 μl Reverser Transkriptase (200 U/ μl) wurde erneut bei 42°C für weitere 50 Minuten inkubiert. Durch Erhitzen (70°C, 15 Min) wurde die Transkription abgestoppt und die cDNA als Template in der PCR auf Ratten oder MS C3 eingesetzt.

2.2.8.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf Ratten oder MS C3

Mit speziesspezifischen Primern wurde aus der durch Reverse Transkription gewonnenen cDNA mit *Taq*-DNA-Polymerase ein etwa 631 bp langes Gensegment aus MS C3 bzw. ein etwa 431 bp langes Gensegment aus Ratten C3 amplifiziert (vgl. 2.2.3.2.6).

Reaktionsansatz für PCR auf C3

5 µl 10x <i>taq</i> -Polymerase Puffer	(1 x im Ansatz)
1,5 µl MgCl ₂ (50 mM)	(Konzentration im Ansatz: 1,5 mM)
1 µl dNTP Mix (je 10 mM)	(Konzentration im Ansatz :0,2 mM)
1 µl Primer 1 (20 µM)	(Konzentration im Ansatz:20 mM)
1 µl Primer 2 (20 µM)	(Konzentration im Ansatz: 20 mM)
1µl Template	
Aqua dest. ad 50 µl	

Als Template wurde die cDNA pur oder in Verdünnungen bzw. als Negativkontrolle destilliertes Wasser eingesetzt. Es wurde eine „hot start“ PCR mit 0,5 µl *taq*-Polymerase pro Ansatz nach dem unter 2.2.3.2.1 beschriebenen Schema durchgeführt. Für die Amplifikation von Ratten C3 wurden als forward Primer (Primer 1) MH64 und MH65 und als backward Primer (Primer 2) MH66 konstruiert. Die Primer MH67 und MH68 bzw. MH69 und MH70 wurden als forward bzw. backward Primer in der PCR auf MS C3 eingesetzt (Primer vgl. Anhang). Zur Kontrolle der Spezies-Spezifität wurden die Primerpärchen auch mit cDNA der jeweils anderen Spezies verwendet. Als Annealingtemperatur wurde 52°C gewählt und der Hauptzyklus der PCR insgesamt 35mal durchlaufen. Zur Überprüfung der durch PCR amplifizierten Gensegmente von Ratten oder MS C3 wurden 10 µl PCR-Produkt mit 5 µl GEBS versetzt und in einem 1,2%igen DNA-Agarosegel zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.3.2.6).

2.2.9 Medikamentöse und operative Eingriffe bei Ratten

2.2.9.1 Technik der orthotopen Lebertransplantation vom MS auf die Ratte (OLT_X)

Die orthotope Transplantation einer MS Leber auf die Ratte wurde in Kooperation mit Dr. Andreas Meyer zu Vilsendorf durchgeführt. Dem narkotisierten Spender (MS) wurde nach Entfernung der rechten Niere und Nebenniere die Leber mit einem infrahepatischen Cavasegment entnommen, um den im Vergleich zum Empfänger (Ratte) geringeren Abstand zwischen supra- und infrahepatischer *Vena cava* bei der Transplantation auszugleichen. Nach

Präparation des Leberhilus und des *Ligamentum hepatoduodenale* wurde die Leberarterie ligiert und eine Cholezystektomie durchgeführt. Die Pfortader wurde bis zum Abgang der *V. lienalis* präpariert. Wenn das geschätzte Gewicht der Spenderleber mehr als 120% der Leber des Empfängers betrug, wurde nach Abschluss der Präparation das Organ in der Größe reduziert (Xu *et al.*, 1994). Zu diesem Zweck wurde eine Resektion des linken lateralen Leberlappens (ca. 30% des Gesamtgewichts) durchgeführt. Die präparierte Leber wurde mit 20 ml Organkonservierungslösung (auf Raumtemperatur erwärmte Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat Lösung) perfundiert und entnommen.

Die Organentnahme beim Empfänger (Ratte) erfolgte unter Inhalationsnarkose mit Ether ohne Modifikation. Die Technik der Lebertransplantation mit fortlaufender Gefäßnaht nach Engemann (1985) ist am besten geeignet, um unterschiedliche Gefäßdurchmesser und geringere Gefäßlänge (vor allem *V. cava* beim MS) auszugleichen. Mit dieser Technik wurden die suprahepatische *V. cava* sowie die Pfortader spannungsfrei anastomosiert. Für die infrahepatische Cava-Anastomose wurde durch das beim Spender mit der Leber entnommene infrahepatische Cava-Segment ausreichend Gefäßlänge gewonnen, so dass auch hier eine spannungsfreie Anastomose möglich wurde.

2.2.9.2 Heterotope Herztransplantation vom MS auf Ratte (HHTX)

Auch die heterotope Transplantation eines MS Herzens auf die Ratte wurde in Kooperation mit Dr. Andreas Meyer zu Vilsendorf durchgeführt, wobei sowohl die Entnahme als auch die Transplantationstechnik an die anatomischen und physiologischen Besonderheiten der eingesetzten Spezies angepasst wurden. Zur Vermeidung einer intravaskulären Aktivierung des Gerinnungssystems wurde während der Organperfusion das Meerschweinchenblut möglichst vollständig aus den Gefäßen nach der von Kaji *et al.* (1995) beschriebenen Methode entfernt.

Das Herztransplantat wurde End-zu-Seit an die infrarenale Aorta und *Vena cava* angeschlossen (Ono und Lindsey, 1969). Aufgrund des wesentlich geringeren arteriellen Mitteldruckes beim MS wurde die Spenderaorta nach Fertigstellung der End-zu-End Anastomose mit der abdominalen Aorta des Empfängers um ca. 1/3 des Gefäßumfanges eingengt. So konnte eine Überdehnung des linken Herzventrikels und eine damit verbundene Funktionseinschränkung verhindert werden.

Der Herzschlag des transplantierten Organs wurde zur Kontrolle zweimal am Tag palpatiert und die Beendigung als Abstoßungszeitpunkt festgestellt.

2.2.9.3 Splenektomie (SPX)

Die Splenektomie der Ratten wurde ebenfalls in Kooperation mit Dr. Andreas Meyer zu Vilsendorf oder der Tierärztin Frau Ursula Raschke durchgeführt. Hierzu wurde unter Ethernarkose ein kurzer Rippenbogenrandschnitt auf der linken Seite gesetzt. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde die Milz vorsichtig hervorluxiert. Die zahlreichen zur Milz führenden Blutgefäße wurden sorgfältig mit einem Bipolar koaguliert und anschließend durchtrennt.

2.2.9.4 B-Zellsuppression mit Malonitrylamid (MNA)/Leflunomid

Arava[®] 100 mg Filmtabletten wurden in einer Porzellanreibschale mit Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Dieses Pulver sowie das pulverförmige MNA wurde in einem Schleim aus 1% CMC in Wasser für Injektionszwecke zu einer homogenen Suspension mit einer Endkonzentration von 5 mg/ml Leflunomid bzw. MNA verarbeitet. Zur B-Zellsuppression wurden den Ratten täglich 10 oder 20 mg Leflunomid bzw. MNA pro kg Körpergewicht oral verabreicht.

2.2.9.5 T-Zellsuppression mit Ciclosporin A

Um die Resorption des stark lipophilen Wirkstoffes Ciclosporin A zu gewährleisten und eine für die Ratten optimale Dosierungsmöglichkeit zu erhalten, wurde Sandimmun[®] Optoral im Verhältnis 1:19 mit Olivenöl gemischt. Zur T-Zellsuppression wurden den Ratten täglich 10 mg Ciclosporin A pro kg Körpergewicht oral verabreicht.

2.2.9.6 Intraportale Injektion von MS Leberzellen

MS Leberzellen wurden wie unter 2.2.5.7 beschrieben aufbereitet. Einer mit Ether betäubten Ratte wurden in Kooperation mit Dr. Andreas Meyer zu Vilsendorf nach medianer Laparatomie jeweils 1×10^7 Zellen langsam in die Pfortader injiziert.

Zur Vermeidung von Infektionen wurde den Ratten nach Gabe von MS Hepatozyten eine Kombination von 20 IE Ampicillin und 8 IE Gentamycin einmalig intramuskulär injiziert. Einen Tag später wurde den Tieren zusätzlich noch einmal die halbe Dosis verabreicht.

2.2.9.7 Depletion der NK-Zellen

Um NK-Zellen zu depletieren, wurden einer Ratte 100 µl des Kaninchen anti-asialo GM1 Serums zusammen mit 900 µl isotonischer Kochsalzlösung in die Penisvene injiziert. Um die Wirksamkeit des Antiserums auch in C6 defizienten PVG Ratten zu gewährleisten, wurde das Antiserum statt in isotonische NaCl-Lösung in MS Serum aufgenommen.

2.2.10 Tierversuchsgruppen

2.2.10.1 Versuchsgruppen und Schemata bei orthotoper Lebertransplantation (OLT_X)

Wie in Tabelle 1 dargestellt, wurde die orthotope Lebertransplantation (OLT_X) von Dunkin Hartley MS auf Lewis Ratten der Gruppen A bis C durchgeführt. Die Ratten der Gruppe A erhielten keine Behandlung (Kontrollgruppe). In den Gruppen B und C wurden die Empfänger durch Applikation von 50 µg CVF am Tag vor und am Tag der Transplantation dekomplementiert. Zusätzlich wurde in Gruppe C der Vasodilatator Epoprostenol (50 µg) in die MS Leber über die *V. portae* kurz vor der Organperfusion injiziert. Bei allen Empfängern wurde der Blutzuckerspiegel vor Hepatektomie, 5, 30 Minuten, 1 Stunde und falls möglich 2, 3 und 6 Stunden nach Reperfusion bestimmt. Zum Vergleich wurde der Blutzuckerspiegel auch bei Lewis Ratten mit einer syngenen Lebertransplantation gemessen. Die durchschnittlichen Überlebenszeiten wurden im Mann Whintney-Test miteinander verglichen. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Gruppe	Stamm	Tag	-1	0
		Anzahl		
A	Lewis	6		
B	Lewis	6	CVF	CVF
C	Lewis	6	CVF Epo	CVF

Tab. 1 : Versuchsgruppen und Schemata bei orthotoper Lebertransplantation (OLT_X).

Erläuterungen: CVF Cobra Venom Faktor 50 µg/Tier

Epo Epoprostenol zur verbesserten Reperfusion des Transplantats 50 µg

2.2.10.2 Versuchsgruppen und Schemata zur Suppression der zellulären und humoralen Effektorsysteme bei heterotoper Herztransplantation (HHTX)

Die heterotope Transplantation eines MS Herzens (HHTX) wurde entweder bei Lewis Ratten (Gruppen D bis H) oder bei PVG Ratten, die einen Defekt im C6 Gen aufweisen (PVG/C6-; Gruppen I bis L) durchgeführt (Tab 2).

Lewis Ratten (Gruppe D) und PVG/C6- Ratten (Gruppe I) ohne Behandlung dienten als Kontrollgruppen. Zur Überprüfung des Einflusses von Komplement wurden Lewis Ratten am Tag -1 und am Tag der Transplantation (Tag 0) mit je 50 µg CVF behandelt (Gruppe E). Um die Konzentration präformierter und induzierter xenogener Antikörper zu reduzieren, wurde eine Kombination aus Splenektomie und Gabe des B-Zellsuppressivums MNA 10 Tage vor der Transplantation in Lewis Ratten (Gruppe F) bzw. dekomplementierten Lewis Ratten (Gruppe G) eingesetzt.

Die Tiere der Gruppen H, K und L wurden am Tag 21 vor der Transplantation splenektomiert und täglich mit dem B-Zellsuppressivum Leflunomid behandelt. Die PVG/C6- Ratten der Gruppe L erhielten eine zweifach höhere Dosis Leflunomid (20 mg/kg) als die Lewis Ratten der Gruppe H und die PVG/C6- Ratten der Gruppe K, denen 10 mg/kg verabreicht wurden. Am Tag -15 wurde in den Gruppen H, K und L mit der täglichen Gabe des T-Zellsuppressivum Ciclosporin A begonnen. Einen Tag später wurden jedem Tier dieser Gruppen 10^7 Leberzellen vom MS in die Pfortader injiziert, wobei die Lewis Ratten (Gruppe H) durch die Gabe von zweimal 50 µg CVF (Tag -15 und -14) für die Dauer von 4 Tagen dekomplementiert wurden. Am Tag nach der Leberzellgabe (Tag -13) bekamen die Ratten je 100 µl des anti- asialo GM1 Antiserums zur Depletion der NK-Zellen. Die heterotope Herztransplantation wurde am Tag 0 durchgeführt, wobei sowohl die Lewis (Gruppe H) als auch die PVG/C6- Ratten der Gruppe K mit 2 Dosen à 50 µg CVF dekomplementiert wurden. Diese 2 Gruppen wurden weiterhin an jedem 2. Tag nach der Transplantation mit je 50 µg CVF behandelt, um das Komplementsystem dauerhaft zu inhibieren.

Gruppe	Stamm	Tag		-21	-15	-14	-13	-10	-1	0	+2	+4
		Anzahl										
D	Lewis	6								HHTX		
E	Lewis	15							CVF	CVF HHTX		
F	Lewis	20						SPX MNA tägl.		HHTX		
G	Lewis	6						SPX MNA tägl.	CVF	CVF HHTX		
H	Lewis	5		SPX Lef10 tägl.	CsA tägl.	CVF LZI	Anti-NK		CVF	CVF HHTX	CVF	CVF
I	PVG/C6-	6								HHTX		
K	PVG/C6-	5		SPX Lef10 tägl.	CsA tägl.	LZI	Anti-NK		CVF	CVF HHTX	CVF	CVF
L	PVG/C6-	4		SPX Lef20 tägl.	CsA tägl.	LZI	Anti-NK			HHTX		

Tab. 2. Versuchsgruppen und Schemata zur Suppression der zellulären und humoralen Effektorsysteme bei heterotoper Herztransplantation (HHTX).

Erläuterungen: Anti-NK anti-asialo GM1 Serum zur Depletion der Natürlichen Killerzellen (NK)
 CsA Cyclosporin A 10 mg/kg
 CVF Cobra Venom Faktor 50 µg/Tier
 HHTX heterotopie Herztransplantation
 LZI intraportale Meerschweinchen Leberzellinfusion 10⁷ Zellen/Tier
 Lef10 Leflunomid 10 mg/kg
 Lef20 Leflunomid 20 mg/kg
 MNA Malonitrylamid 10mg/kg
 SPX Splenektomie

2.2.10.3 Versuchsgruppen zur Analyse der XNA

Zur Analyse der XNA in unbehandelten Ratten wurde das Serum von je 10 Lewis und PVG/C6-Ratten im ELISA und im Immunblot gegen die Membranpräparationen von primären MS Zellen (Leber, Milz und Thrombozyten) sowie der Zelllinie JH4 getestet.

Um eine Änderung der XNA-Spiegel im Serum aufgrund des Einflusses verschiedener Behandlungsschemata zu analysieren, wurden die von einer 1:2 Verdünnung im ELISA ermittelten OD-Werte eines Individuums ausgewertet. Die ELISA Signale wurden dazu prozentual auf den individuellen Ausgangswert vor Behandlungsbeginn bezogen. Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den XNA-Spiegel in unbehandelten Lewis und PVG/C6-Ratten zu ermitteln, wurde der Student's t-test durchgeführt. P-Werte $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Der Einfluss der täglichen oralen Gabe des B-Zellsuppressivums Leflunomid auf die anti-MS Antikörper wurde an insgesamt 4 PVG/C6- Ratten untersucht, wobei 2 Tiere an Stelle von 10 mg/kg die doppelte Dosis (20 mg/kg) erhielten. Das Serum der Ratten wurde 3 und 7 Tage nach Behandlungsbeginn im ELISA gegen Membranextrakte von MS Leberzellen getestet.

Änderungen der XNA-Spiegel durch Applikation von MS Antigen ohne bzw. mit B-Zellsuppression wurden bei Lewis Ratten der Gruppen M bzw. N (Tab. 3) im ELISA gegen MS Leberextrakte untersucht. Jedem Tier wurden am Tag 0, unter vorheriger Dekomplementierung durch zweimalige Gabe von 50 μg CVF, jeweils 1×10^7 MS Leberzellen intraportal gespritzt, wobei die Ratten der Gruppe N 10 Tage zuvor splenektomiert und täglich mit dem B-Zellsuppressivum MNA (10 mg/kg) behandelt worden waren. Bestimmt wurden die IgG und IgM XNA in den individuellen Seren aller Tiere der Gruppe M vor Infusion mit MS Hepatozyten sowie in den Seren von jeweils mindestens 2 Individuen der Gruppe I 3 Stunden und 1, 3, 7, 14 sowie 21 Tage nach Leberzellgabe. Das Serum jeder Ratte der Gruppe N wurde vor Splenektomie (Tag -10), an den Tagen 5 und 1 vor Leberzellgabe sowie 3 Stunden, 1, 3 und 7 Tage nach Infusion mit MS Leberzellen auf vorhandene IgM XNA getestet.

Auch bei den Lewis und PVG/C6- Ratten, in die nach einer Kombination aus Splenektomie, B- und T-Zellsuppression, MS-Leberzellinfusion (LZI) und NK-Zell-Depletion ein MS Herz heterotop transplantiert wurde (Tab. 2, Gruppen H, K und L), wurden die IgG und IgM XNA vor Splenektomie (Tag -21), vor LZI (Tag -15), 24 Stunden nach LZI (je 2 Tiere der Gruppen G und H), vor der Transplantation (Tag -1) sowie nach erfolgter Abstoßung bestimmt. Hierzu wurden die Seren der Lewis Tiere (Gruppe H) gegen MS Leberzellmembran und die der PVG/C6- Ratten (Gruppen K und L) gegen Membranextrakte der JH4 Zelllinie im ELISA getestet.

Gruppe	Stamm	Tag	-10	-1	0
		Anzahl			
M	Lewis	10		CVF	CVF LZI
N	Lewis	4	SPX MNA tägl.	CVF	CVF LZI

Tab. 3. Versuchsgruppen zur Analyse der XNA. Erläuterungen vgl. Tab. 2.

2.2.10.4 Versuchsgruppen zur Analyse der B-Zellen und NK-Zellen

Eine Analyse der B-Zellen, insbesondere der CD5-positiven B-Zellen und der NK-Zellen wurde bei Lewis (Tab. 4 Gruppe O) und bei PVG/C6- Ratten (Tab. 4 Gruppe P) durchgeführt. Zur durchflußzytometrischen Bestimmung der B- und NK-Zellen wurde den mit Ether betäubten Tieren durch Punktion des Augenhintergrundes eine geringe Menge ACD-Blut (maximal 0,5 ml) entnommen und nach Lyse der Erythrozyten die in 100 µl ACD-Blut enthaltenen Leukozyten in der Durchflußzytometrie eingesetzt (vgl. 2.2.7.3). Zur Analyse der Zytotoxizität wurden die aus dem gesamten ACD-Blut der mit CO₂ getöteten Tiere isolierten PMBCs in einem Chromfreisetzungstest verwendet (vgl. 2.2.5.5 und 2.2.7.3).

Gruppe	Stamm	Tag	-21	-15	-14	-13
		Anzahl				
O	Lewis	5	SPX Lef10 tägl.	CVF CsA tägl.	CVF LZI	Anti-NK
P	PVG/C6-	5	SPX Lef10 tägl.	CsA Tägl.	LZI	Anti-NK

Tab. 4. Versuchsgruppen zur Analyse der B- und NK-Zellen. Erläuterungen vgl. Tab. 2.

Analog zu den Ratten der Gruppen H, K und L (Tab. 2) wurden die Tiere der Gruppen O und P am Tag -21 splenektomiert und täglich mit dem B-Zellsuppressivum Leflunomid (10 mg/kg) behandelt. Am Tag -15 startete die tägliche Gabe des T-Zellsuppressivums Ciclosporin A (10 mg/kg), und die Lewis Tiere der Gruppe O wurden zusätzlich durch die zweimalige Gabe von 50 µg CVF pro Tier dekomplementiert (Tag -15 und -14). Die Tieren erhielten am Tag -14 eine intraportale Infusion mit je 1×10^7 MS Leberzellen und einen Tag später (Tag -13) 100 µl des anti-asialo GM1 Antiserums zur Depletion der NK-Zellen. Im Gegensatz zu den Tieren der Gruppen H, K und L wurde bei den Ratten der Gruppen O und P keine heterotope MS Herztransplantation am Tag 0 durchgeführt.

Die NK- und B-Zellen wurden vor Behandlungsbeginn (Tag -21), vor Leberzellinfusion (Tag -15) sowie 3, 10, 17, 21 und zum Teil 28 Tage nach Infusion mit MS Hepatozyten bestimmt (Tag -15, -11, -3, +4, +10 und zum Teil +16). Zur Bestimmung der Zytotoxizität der NK-Zellen wurde bei 2 PVG/C6- Ratten (Gruppe P) bzw. bei allen anderen Tieren 25 bzw. 33 Tage (Tag +14 bzw. +20) nach Leberzellinfusion die PMBCs in einem Chromfreisetzungstest eingesetzt. In diesem Zytotoxizitätstest wurden auch die PMBCs einer PVG/C6- Ratte gemessen, die bis auf die Depletion der NK-Zellen das gleiche Regime wie die Tiere der Gruppen O und P erfahren hatte.

2.2.10.5 Versuchsgruppen zur Analyse von C3 nach intraportaler Infusion mit MS Leberzellen

Zum Nachweis von MS bzw. Ratten C3 mittels RT-PCR wurden zunächst unbehandelten Tieren (MS und Ratten) die Leber entnommen und nach Isolierung der Gesamt-RNA die Speziespezifität und die Nachweisgrenze der entwickelten Methode getestet.

Um die Absiedelung bzw. Zirkulation von MS Leberzellen mit dieser Methode zu analysieren, wurden insgesamt 8 Lewis Ratten am Tag -1 und Tag 0 durch je 50 µg CVF dekomplementiert. Am Tag 0 wurde den Tieren 1×10^7 MS Leberzellen intraportal infundiert. Je 2 Tieren wurde nach 3 Stunden, 1, 3 und 7 Tagen nach Leberzellinfusion die Leber entnommen und für die Isolation von Gesamt-RNA und RT-PCR auf MS und Ratten C3 eingesetzt.

Die Speziespezifität und Nachweisgrenze der RT-PCR auf Ratten C3 nach Isolation der Gesamt-RNA aus dem nach Serumgewinnung aus etwa 1 ml Blut anfallenden Blutkuchen wurden an 10 unbehandelten Lewis und 5 unbehandelten PVG/C6- Ratten getestet. Nach Isolation der Gesamt-RNA aus Blutkuchen wurde eine RT-PCR auf C3 bei 3 Lewis bzw. 4 PVG/C6- Ratten durchgeführt, wobei diese Tiere 7 Tage vor Infusion mit 1×10^7 MS

Leberzellen splenektomiert und B-Zell-supprimiert (10 mg/kg MNA bei Lewis bzw. 10 mg/kg Leflunomid bei PVG/C6-) wurden. Bei diesen Tieren wurde die RT-PCR 3 Stunden und 1 Tag nach Infusion mit MS Hepatozyten durchgeführt.

2.2.11 Histopathologische und immunhistochemische Analyse der Transplantate

Die histopathologische und immunhistochemische Analyse der Transplantate wurde in Kooperation mit Dr. Andreas Meyer zu Vilsendorf und Frau Dr. Anne Jörns, Abteilung Anatomie der MHH, durchgeführt. Zur Beurteilung der Histologie wurde von Paraffinschnitten der Organe eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefertigt. Die Apoptose von Zellen wurde bei MS Lebern nach orthotoper Transplantation auf die Ratte ebenfalls in Paraffingewebeschnitten analysiert. Immunhistochemische Analysen wurden auf Gefrierschnitten der abgestoßenen Organe nach OLTX oder HHTX von MS auf Ratte durchgeführt.

2.2.11.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Beurteilung der Histologie des abgestoßenen Gewebes wurden die Organe nach Fixierung in Formalin in Paraffin eingebettet. Schnitte davon wurden zunächst mit Hämatoxylin und anschließend mit Eosin (0,05%) gefärbt.

2.2.11.2 Nachweis von Apoptose

Die Apoptose von Hepatozyten nach OLTX wurde durch die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP nick end labelling) mit einem TUNEL-Testkit untersucht. Die Testdurchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Methodisch erfolgt eine durch das Enzym Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) katalysierte dUTP-Flourescein-Markierung von DNA-Bruchstellen (nick-end labelling). Eingesetzt wurden hierbei Gewebeschnitte von in Paraffin eingebetteten Organen.

2.2.11.3 Immunhistochemische Analyse

In der Immunhistochemie wurde zum einen die Möglichkeit der Detektion von C5-Ablagerungen in einem Rattenherz nach xenogener Herzperfusion im MS durch Einsatz der aufgereinigten anti-MS C5 scFvs überprüft. Hierfür wurden Herzen von Lewis Ratten heterotop in das Abdomen von C2BB/R+ MS nach der von Ono und Lindsey (1969) beschriebenen Technik transplantiert und 30 Minuten nach xenogener Perfusion *in situ* wieder entnommen. Zum anderen wurde in der Immunhistochemie die Infiltration der abgestoßenen Transplantate mit

Ratten NK-Zellen oder Makrophagen sowie die Ablagerung von Ratten C3, C6, C9 oder IgM analysiert.

Von den Organen wurden nach Einfrieren in Flüssigstickstoff (-195°C) 0,5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Die aufgetauten Schnitte wurden 1 Stunde lang getrocknet, mit Aceton fixiert (10 Minuten) und zur Vermeidung unerwünschter Hintergrundfärbungen vorbehandelt. Während der Vorbehandlung wurden endogene Peroxidasen durch 20-minütige Inkubation mit 0,6% H₂O₂ in Methanol bzw. auf Leberschnitten die endogene Avidin bindende Aktivität durch Inkubation mit 0,01% Avidin und 0,001% Biotin blockiert (Wood und Warnke, 1981). Um eine unspezifische Bindung der später eingesetzten Sekundäntikörper von Maus bzw. Ziege zu verhindern, wurden die Schnitte zudem mit 2% Maus- bzw. Ziegenserum in PBS für 30 Minuten inkubiert.

2.2.11.3.1 Detektion von C5-Ablagerungen nach *in situ* xenogener Herzperfusion

Nach xenogener *in situ* Perfusion von Rattenherzen wurde die Eignung von MS C5-spezifischen scFvs zur Detektion von C5-Ablagerungen in der Immunhistochemie untersucht. Dazu wurden die vorbehandelten Gefrierschnitte mit einer 1:50 Verdünnung von MS C5-spezifischen scFvs (16 Stunden bei 4°C) und anschließend mit dem monoklonalen anti-c-Myc Antikörper 9E10 (1:50 verdünnt) für 3 Stunden inkubiert. Nach Inkubation mit einer 1:150 Verdünnung des Peroxidase-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Antikörpers (1 Stunde) wurden die Schnitte durch Zugabe der Diaminobenzidin-Substratlösung gefärbt. Zur Spezifitätskontrolle wurden Gewebeschnitte von Rattenherzen gefärbt, die nach syngener, orthotoper Herztransplantation gewonnen wurden.

2.2.11.3.2 Detektion der Infiltration mit Makrophagen oder NK-Zellen sowie Ablagerungen von IgM oder Komplementproteinen der Ratte

Zur Detektion der Infiltration mit Ratten Makrophagen oder NK-Zellen wurden eine 1:500 Verdünnung des Maus anti-Ratte Makrophagen Antikörpers (ED1) oder eine 1:100 Verdünnung des Maus anti-Ratte NKR-P1 Antikörpers bzw. des aufgereinigten mAk 3.2.3 (vgl. 2.2.7.1) als Primäntikörper auf Gefrierschnitten von Lebern bzw. Herzen nach orthotoper Lebertransplantation bzw. heterotoper Herztransplantation von MS auf Ratte eingesetzt. Auf diesen Organen wurden auch die Ablagerungen von Ratten IgM mit einer 1:100 Verdünnung des Maus anti-Ratte IgM (MARM-4) Antikörper detektiert. Unter Verwendung von Maus anti-Ratte C3 (ED11, 1:1000), sowie der Maus anti-human C6 und C9 Antikörper (jeweils 1:5), die mit Ratte kreuzreagieren (Baker *et al.*, 1989), wurden Ablagerungen von Komplementproteinen nachgewiesen. Die vorbehandelten Gefrierschnitte wurden mit den in PBS verdünnten

Primärantikörpern über Nacht (16 Stunden) bei 4°C inkubiert und anschließend mit einer 1:100 Verdünnung des biotinylierten Kaninchen anti-Maus IgG Antikörpers in PBS für 30 Minuten inkubiert. Nach Interaktion mit dem Streptavidin-Biotin-Komplex für 30 Minuten erfolgte durch Zugabe von Diaminobenzidin-Substratlösung die abschließende Farbreaktion.

Die Infiltrationen mit Makrophagen oder NK-Zellen wurden densitometrisch ausgewertet (Jörns *et al.*, 1999). Dazu wurden die Schnitte in einem Photomikroskop (Photomikroskop II, Zeiss) mit einer Videokamera (Sony CCD DXC-151 AP) aufgenommen und die gefärbten Zellen nach Aufbereitung der Aufnahmen mit der Software NIH Shareware Image Analysis Version 1.59 anhand eines Rasters pro mm² gezählt. Die Ergebnisse bei den einzelnen Versuchsgruppen wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet.

3 Ergebnisse

Im Laufe dieser Arbeit wurden zum einen die orthotope Lebertransplantation (OLT_X) von Meerschweinchen (MS) auf Ratte etabliert sowie Tools zu einer Überprüfung der Stoffwechselsyntheseleistung der Leber nach Langzeitüberleben entwickelt. Zum anderen wurden die immunologischen und zellulären Mechanismen der Abstoßung und deren Überwindung bei der heterotopen Herztransplantation (HHT_X) im gleichen Tiermodell analysiert.

Vor seinem Einsatz als Komplementinhibitor während der OLT_X und später auch bei der HHT_X wurde zunächst Cobra Venom Faktor (CVF) aufgereinigt und seine Aktivität ermittelt. Zur Überprüfung der Stoffwechselleistung nach OLT_X wurden Antikörper gegen MS Komplementproteine aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Eignung als diagnostische oder therapeutische Reagenzien analysiert.

3.1 Aufreinigung und Aktivitätsbestimmung von Cobra Venom Faktor (CVF)

Das Lyophilisat des käuflich erworbenen Cobra Venom Faktor (CVF) wurde über einen Anionenaustauscher aufgereinigt. Die antikomplementäre Aktivität des aufgereinigten CVF wurde *in vitro* gegen normales humanes Serum (NHS) und *in vivo* nach Applikation in Lewis Ratten im hämolytischen Test analysiert.

3.1.1 Aufreinigung von CVF

Zur Aufreinigung von CVF wurde ein Anionenaustauscher (Mono Q) verwendet. Der krude Extrakt von CVF enthielt unter anderem Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 115 kD und etwa 55 kD, die nicht an den Anionenaustauscher banden und daher gewaschen wurden (Abb. 6, Spuren 1 und 2). Mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 350 mM, unterbrochen von einer längeren Elution bei 260 mM, wurden die restlichen Proteine aufgetrennt. Die ersten 11 bis 15 der mit 260 mM Salzlösung eluierten Fraktionen wiesen in der SDS-PAGE drei Proteinbanden bei etwa 70, 60 und 50 kD auf (Abb. 6, Spur 3). Bei den folgenden 20 bis 30 Elutionsfraktionen fehlte die obere, etwa 70 kD schwere Bande (Abb. 6, Spur 4). Entsprechend der Proteinbandenanzahl wurden aus den Elutionsfraktionen 2 Pools gebildet und der Proteingehalt bestimmt. Im Schnitt wurden aus 100 mg Lyophilisat insgesamt 1,7 mg Protein aufgereinigt, das zu etwa 50 % in beiden Pools aufgeteilt war.

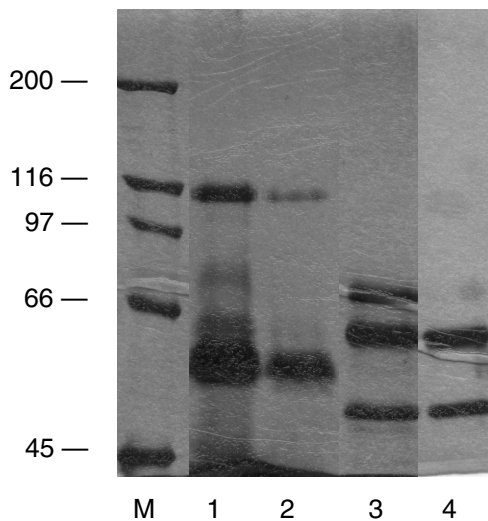


Abb. 6. Aufreinigung von Cobra Venom Faktor (CVF).

Das Lyophilisat von CVF wurde über einen Anionenaustauscher durch Elution mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 350 mM, unterbrochen von einer längeren Elution bei 260 mM, aufgereinigt. Gezeigt sind Durchlauf beim Probenauftrag (Spur 1), exemplarisch eine Waschenfraktion (Spur 2) sowie zwei der mit 260 mM eluierten Fraktionen (Spuren 3 und 4) in der SDS-PAGE. M: Marker high range.

3.1.2 Überprüfung der antikomplementären Aktivität von CVF

Die antikomplementäre Aktivität von aufgereinigtem CVF wurde *in vitro* im hämolytischen Test gegen eine CH50 Einheit normales humanes Serum (NHS) getestet, d.h. gegen die Menge NHS, welche eine 50%ige Hämolyse der eingesetzten sensibilisierten Schafserythrozyten erzeugt. Die CH50 Einheit des eingesetzten NHS entsprach 37,5 µl einer 1:20 Verdünnung. Dieses Volumen NHS wurde mit verschiedenen Verdünnungen aufgereinigtem CVF inkubiert und daraufhin im hämolytischen Test eine Reduktion der Hämolyse festgestellt. Eine Einheit (IU) CVF wird definiert als die Menge, die eine CH50 Einheit NHS zu 50% inhibiert. Im Schnitt enthielt eine Einheit 472 ng aufgereinigten CVF (je nach Aufreinigung 246 bis 613 ng).

Um die antikomplementäre Aktivität von aufgereinigtem CVF *in vivo* zu untersuchen, wurden Lewis Ratten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit unterschiedlichen Dosen behandelt und das Serum der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten im hämolytischen Test analysiert. Als Bezugsgröße diente dabei die Lyse der eingesetzten Erythrozyten, die durch Zusatz des individuellen Serums vor jeglicher Behandlung erzielt wurde. Je nach gewählter Dosis und Applikationsart wurden unterschiedlich starke Reduktionen der durch das Serum hervorgerufenen Hämolyse erzielt, deren Dauer ebenfalls variierte.

Die intravenöse Applikation von 40 IU CVF führte nach 24 Stunden bei den Tieren 1 und 2 zu einer Reduktion der Hämolyse um etwa 80% (Abb. 7, A). Danach wurden beiden Ratten 20 IU CVF intravenös injiziert. Die Hämolyse stieg weitere 24 Stunden später (48 Stunden nach Behandlungsbeginn) auf etwa 70% (Tier 1) bzw. 40% (Tier 2) an. 96 Stunden nach Behandlungsbeginn erreichte die Hämolyse bei beiden Tieren ihren Ausgangswert.

Bei Erhöhung der Dosis auf 80 IU und 40 IU wurde die Hämolyse stärker und dauerhafter reduziert (Abb. 7, B). Das Serum von 2 Lewis Ratten zeigte nach Verabreichung von 80 IU eine Abnahme der Hämolyse innerhalb von 24 Stunden auf 13% bzw. 5%. 24 Stunden nach Behandlung mit 40 IU CVF lag die Hämolyse bei 17% (Tier 3) bzw. 12% (Tier 4) an. An den Tagen 3 bzw. 4 nach Behandlungsbeginn lysierte das Serum von Tier 3 die Erythrozyten zu 45% bzw. 67% und das von Tier 4 zu 32% bzw. 50%. Nach 5 Tagen erreichte die Hämolyse von Tier 3 90% und die von Tier 4 72%.

Die intraperitoneale an Stelle der intravenösen Applikation führte zu einer deutlich geringeren Reduktion der Hämolyse. Ein Tag nach intraperitonealer Gabe von 80 IU CVF nahm die Hämolyse bei Tier 5 bzw. 6 auf 60 bzw. 65% ab (Abb. 7, C). Die folgende Gabe von 40 IU, ebenfalls intraperitoneal, zeigte keinen Einfluss auf die Hämolyse (48 Stunden nach Behandlungsbeginn). Drei Tage nach Behandlungsbeginn stieg die Hämolyse bereits auf 94% (Tier 5) bzw. 90% (Tier 6) an und erreichte am Tag 4 ihren Ausgangswert.

Weiteren 2 Lewis Ratten wurden je 50 µg und 20 µg aufgereinigter CVF intravenös verabreicht. Die Hämolyse der Seren nach 24 Stunden, also noch vor Gabe der 2. Dosis, war bei beiden Tieren um etwa 95% reduziert (Abb. 7, D). Zwei Tage nach Behandlungsbeginn war bei beiden Tieren keine Hämolyse mehr festzustellen. An den Tagen 3 bzw. 4 stieg die Hämolyse auf 17% bzw. 36% (Tier 7) und auf 10% bzw. 20% (Tier 8) an. Weitere 24 Stunden später erreichte die Hämolyse des Tieres 7 72% und die des Tieres 8 50%.

In einer Versuchsgruppe aus 6 Lewis Tieren wurde die Abnahme der Hämolyse durch intravenöse Applikation von zweimal 50 µg aufgereinigtem CVF analysiert. Diese Dosierung und Applikationsweise führte zur dauerhaftesten Reduktion der Hämolyse für die Dauer von 3 Tagen (Abb. 7, E). Im Mittel nahm die Hämolyse 18 und 24 Stunden nach der 1. Gabe von 50 µg CVF um etwa 90% ($\pm 3,8$) Prozent ab. Zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden nach Behandlungsbeginn war keine hämolytische Aktivität. Nach 96 Stunden stieg sie langsam auf 15,3% ($\pm 1,6$) an und erreichte nach 120 Stunden 52% ($\pm 14,2$).

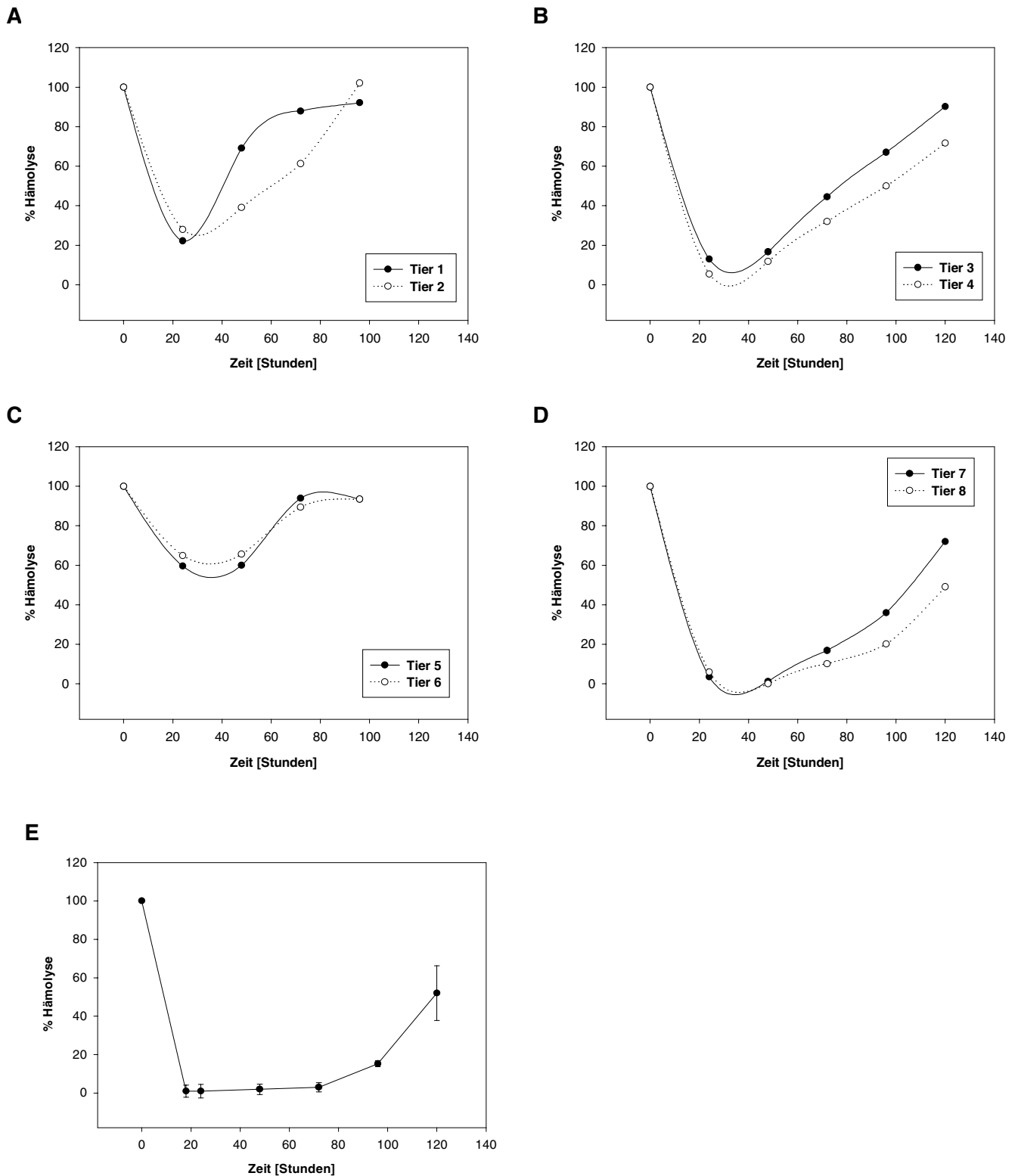


Abb. 7. Antikomplementäre Aktivität von CVF *in vivo*.

Je 2 Lewis Ratten wurden an 2 aufeinander folgenden Tagen 20 und 40 IU CVF intravenös (A), 40 und 80 IU CVF intravenös (B) und intraperitoneal (C) oder 50 und 20 μ g CVF intravenös (D) sowie je 6 Lewis Ratten zweimal 50 μ g CVF intravenös (E) verabreicht und die vom Serum induzierte Lyse von Erythrozyten im hämolytischen Test ermittelt.

3.2 Charakterisierung und Verwendung von Antikörpern gegen die Meerschweinchen Komplementproteine C5 und C5a

Antikörper gegen Komplementproteine des Meerschweinchens (MS) können zum einen zur genaueren Analyse oder gar zur Inhibition der Komplementaktivierung eingesetzt werden. Zum anderen kann mit ihnen die Stoffwechselleistung einer orthotop in Ratten transplantierten MS Leber überprüft werden.

Es standen gegen MS C5 und C5a gerichtete Antikörper in Form von scFvs zur Verfügung, bei denen die variablen Teile der leichten Kette (V_L) und der schweren Kette (V_H) über einen $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ -Linker miteinander verknüpft sind. Diese Antikörper waren nach Generierung von scFv-Antikörperbanken durch Selektion mittels Phage-Display isoliert worden (Güteryüz, 1999). Die Antikörperbanken wurden aus der RNA aus Blut und Milz von mit MS C5 immunisierten Mäusen hergestellt, indem die genetische Information je einer V_H Domäne aus dem Repertoire der variablen schweren $\text{Ig}\gamma 1$ bzw. $\text{Ig}\gamma 2a$ Ketten mit einem Gen für eine V_L Domäne aus dem Repertoire der variablen leichten κ Ketten kombiniert wurden. Diese DNA-Fragmente der scFvs wurden in den Phagemid Vektor pHEN1 kloniert und konnten nach Transformation in den *E.coli* Stamm TG1 nach Superinfektion mit dem Helferphagen VCS-M13 als scFvs auf der Phagenoberfläche exprimiert werden. Im Phage Display wurden innerhalb mehrerer Panningrunden MS C5 und MS C5a-bindende Klone selektiert. Es waren 4 verschiedene anti-MS C5 scFvs (B3; H10 E10 und F11) vorhanden, deren DNA nach Restriktionsverdau mit *Bst*N1 individuelle Muster zeigten und die, auch als soluble Proteine, keine Kreuzreaktivität mit MS C5a, humanem C5 oder humanem C5a aufwiesen. Außerdem gab es einen MS C5a-spezifischen Klon (D10), der zwar nicht mit humanem C5 oder C5a jedoch mit MS C5 kreuzreagierte.

Im Laufe dieser Arbeit wurden die Klone sequenziert und die Subgruppen der V_H und V_L -Ketten bestimmt (vgl. Tab 5 und Anhang). Die schwere Kette des anti-MS C5 Klons B3 gehörte in die Subgruppe III D und die leichte κ Kette zur Subgruppe I. Die leichten κ Ketten der anderen gegen MS C5 gerichteten Klone H10, E10 und F11 gehörten alle in die Subgruppe V; während die schweren Kette dieser Klone unterschiedlichen Subgruppen zugeordnet wurden. Der anti-MS C5 spezifische Klon D10 besaß eine leichte κ Kette der Subgruppe II und eine in die Subgruppe VA einzuordnende schwere Kette.

	Klon	V _H Subgruppe	V _L Subgruppe
Anti-MS C5 scFvs	B3	III D	I
	E10	V A	V
	H10	III C	V
	F11	II C	V
Anti-MS C5a scFvs	D10	V A	II

Tab. 5. Subgruppierung der MS C5- und C5a- spezifischen scFvs.

3.2.1 Aufreinigung der anti-MS C5 scFvs

Um die Bindungsaffinitäten und weitere Anwendungsmöglichkeiten der anti-MS C5 Antikörper zu bestimmen, wurden soluble scFvs aus den Klonen B3, H10, E10 und F11 aufgereinigt. Für die Aufreinigung stand unter anderem die Metallchelate-Chromatographie zur Verfügung. Hierfür mussten die in den Phagemid Vektor pHEN1 inserierte scFv-spezifische DNA in den Vektor pCANTAB6 umklont werden. Werden die scFvs als lösliche Proteine im Vektor pCANTAB6 exprimiert, tragen sie am C-Terminus einen 6x Histidin-Rest. Über die Imidazolringe der Histidine können die scFvs eine Chelatbindung mit an eine Matrix immobilisierten Metallionen eingehen und so von anderen Proteinen abgetrennt werden. Für die Umklonierung in den Vektor pCANTAB6 wurden die im Vektor pHEN1 vorliegende DNA der scFvs über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Je 50 µl dieser PCR-Ansätze (schätzungsweise maximal 2,5 µg DNA) wurden nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkoholfällung mit den Restriktionsenzymen *Sfi*I und *Not*I verdaut. Parallel dazu wurden 2 µg des Phagemid Vektors pCANTAB6 ebenfalls mit diesen beiden Enzymen geschnitten. Vor der Ligation mit dem Vektor wurden die geschnittenen Inserts noch mal Phenol-Chloroform extrahiert und mit Alkohol gefällt. Der geschnittene Vektor wurde in einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 8) Dabei wurde das in ihm enthaltene etwa 700 bp schwere Insert, ein scFv spezifisch für MS C3, von dem etwa 4,4 kb schweren Vektor abgetrennt. Die Bande des geschnittenen Vektors wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltenen DNA über Glasmilchbeads aufgereinigt. Während dieser Schritte ist schätzungsweise ein 50%iger Verlust aufgetreten, so dass nur etwa 1 µg Vektor für die Ligation mit den 4 verschiedenen Inserts zur Verfügung stand. Da auch noch eine Negativkontrolle (Mock-Kontrolle) angesetzt wurde, bei der Vektor ohne Insert die Ligation durchläuft, wurden je Ligationsansatz 150 ng Vektor und 100

ng Insert nach gemeinsamer Alkoholfällung miteinander ligiert. Diese DNA wurde anschließend in kompetente *E.coli* HB2151 elektrotransformiert. Es konnten einzelne Klone isoliert werden, die ein Insert von etwa 700 bp trugen, was der Ausgangs-DNA der einzelnen Klone entsprach, wie in einem Vergleich der Restriktionsmuster vor und nach Umklonierung durch *Bst*NI-Verdau der Inserts festgestellt werden konnte.

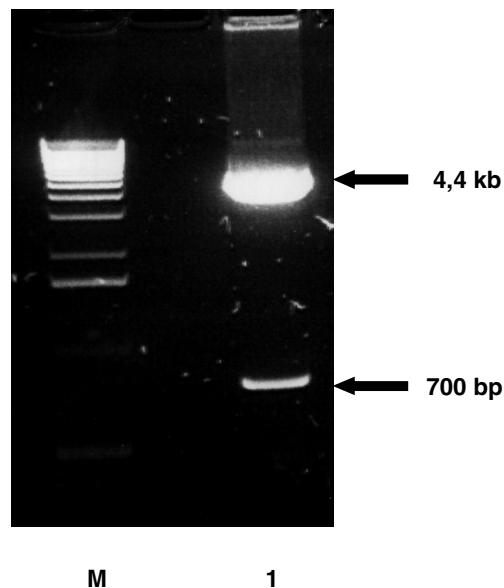


Abb. 8. Aufreinigung des mit *Sfi*I und *Not*I verdauten Phagemid Vektors pCANTAB6 über ein DNA-Agarosegel.

Nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *Sfi*I und *Not*I wurde der geschnittenen Vektor pCANTAB6 auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Spur 1). Die obere Bande bei etwa 4,4, kb wurde ausgeschnitten und nach Aufreinigung über Glasmilchbeads für die Ligation mit den anti-MS C5-spezifischen scFvs- Inserts eingesetzt. M: Marker 1 kb ladder.

Für die Aufreinigung wurde von jedem Klon aus dem Vektor pCANTAB6 in einer 1l-Kultur lösliche scFvs produziert und der Überstand zunächst in einem Filtrationsverfahren auf das 20fache ankonzentriert. Die Aufreinigung über Metallchelate-Chromatographie an Ni^{2+} Ionen zeigte nur unbefriedigende Ergebnisse (Abb. 9, Spur 1). Nach Elution mit einem 300 mM Imidazol-haltigen Puffer waren neben der Proteinbande der scFvs bei etwa 30 kD noch weitere Banden mit höherem und niedrigerem Molekulargewicht vorhanden. Auch eine Änderung der Elutionsbedingungen von der mit Metallionen beladenen Säulenmatrix wie „Voreluieren der Säule“ mit einem Puffer mit niedrigerem Imidazol-Gehalt verbesserte dieses Ergebnis nicht, sondern führte zu einem Verlust von scFvs bei dieser Vorelution. Daher wurden die nach

Metallchelate-Chromatographie erzielten Elutionsfraktionen nochmals über Gelfiltration aufgereinigt. Die Überprüfung der Aufreinigung durch Gelfiltration ergab in der SDS-PAGE eine einzelne Proteinbande bei etwa 30 kD (Abb. 9, Spur 3). Mit diesem Verfahren wurden reine scFvs gewonnen, die allerdings in 30 bis 45 einzelne Elutionsfraktionen à 1ml aufgeteilt waren, so dass nur eine sehr niedrige Proteinkonzentration vorlag. Daher wurden die scFvs nochmals mittels Ultrazentrifugation ankonzentriert und dabei gleichzeitig entsalzt. Die Ausbeute der Aufreinigung über Metallchelate-Chromatographie kombiniert mit Gelfiltration aus einer 1l-Kultur betrug typischerweise 1,2 bis 4 mg reine scFvs. Die scFvs der Klone B3, E10 und H10 überstanden dieses recht aufwendige Aufreinigungsverfahren, ohne ihre Bindungsfähigkeit an MS C5 zu verlieren, was in einem ELISA nachgewiesen wurde.

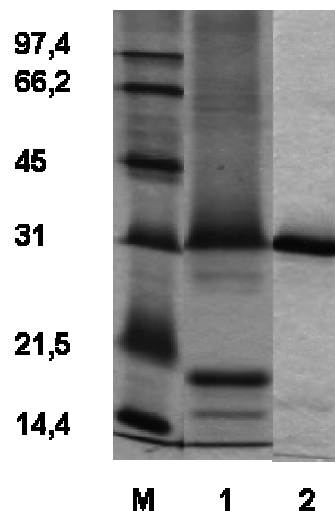


Abb. 9. Aufreinigung von MS C5-spezifischen scFvs über Metallchromatographie und Gelfiltration. Die Elutionsfraktionen der scFvs H10 nach Metallchelate-Chromatographie (Spur 1) wurden anschließend über eine Gelfiltrationssäule (Spur 2) aufgetrennt. M: Marker low range.

Als Alternativmethode zu dem 2-Schritt-Verfahren der Kombination aus Metallchelate-Chromatographie und Gelfiltration wurde die Aufreinigung über Affinitätschromatographie an Protein L getestet. Protein L stammt aus der Zellwand des Bakteriums *Peptostreptococcus magnus* und bindet speziell die variable Domäne der leichten Ketten, ohne mit der Antigenbindungsstelle zu interferieren. Es wurden ankonzentrierte scFvs auf eine mit Protein L beladene Säule gegeben und die Bindung der scFvs an Protein L im Dot Blot analysiert. Nur scFvs des Klones B3, die die leichte Ketten vom Subgruppe $\kappa 1$ exprimierten, zeigten eine Bindung an Protein L (Abb. 10, A). Alle anderen MS C5-spezifischen Klone, die leichte Ketten

der Subgruppe κV aufwiesen, hingegen nicht. Mit der Affinitätschromatographie an Protein L konnten also nur scFvs vom Klon B3 aufgereinigt werden. Die Elutionsfraktionen wiesen eine Proteinbande bei etwa 30 kD auf (Abb. 10, B). Aus einer 1l-Kultur konnten auf diese Weise 2 mg reine scFvs isoliert werden.

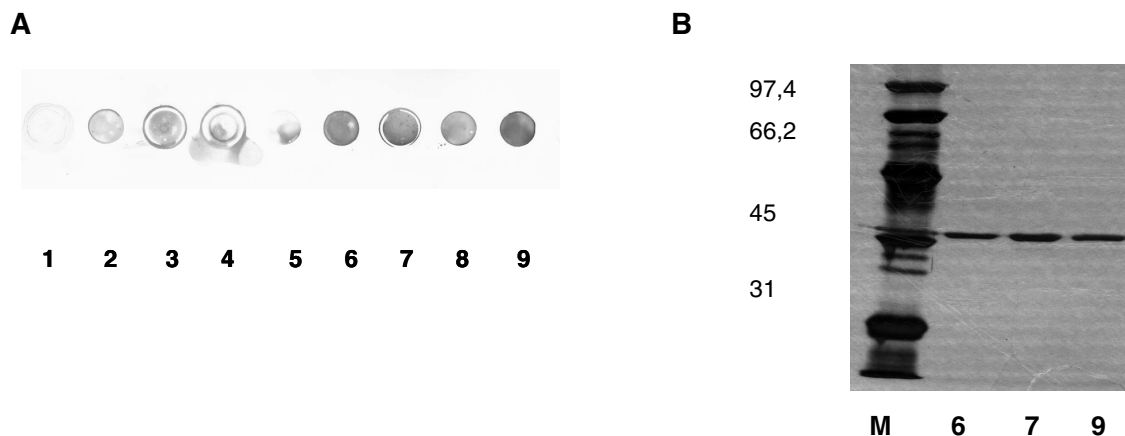


Abb. 10. Aufreinigung der MS C5-spezifischen scFvs über Protein L Affinitätschromatographie.

(B) Dot Blot Analyse der verschiedenen Fraktionen der scFvs des Klones B3 aus der Affinitätschromatographie über Protein L. Die Punkte 1 bis 5: Waschen nach Beladen der Säule. Punkte 6 bis 9: Elutionsfraktionen.

(B) SDS-PAGE und Silberfärbung der Elutionsfraktionen 6, 7 und 9. M: Marker low range.

3.2.2 Affinitätsbestimmung

Die Bindungsaffinitäten (K_D) der MS C5-spezifischen scFvs wurden mit Hilfe der „Surface Plasmon Resonance“ Analyse (SPR) ermittelt. Dazu wurden aufgereinigte scFvs an einen Sensorchip gekoppelt und MS C5 in unterschiedlichen Konzentrationen mindestens zweimal vermessen. Aus den Kurven wurden mit Hilfe der BIAevaluationssoftware 3.0 die Assoziations- (k_a) und Dissoziationsraten (k_d) ermittelt. Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation (K_D) wurde aus dem Quotienten k_a/k_d errechnet. Wie in Tabelle 6 gezeigt reichten die K_D s von $1,48 \times 10^{-8}$ bis $2,75 \times 10^{-7}$ M. Die scFvs des Klons E10 zeigten die höchste Assoziationsrate (k_a) von $1,2 \times 10^5$ 1/Ms. Die scFvs des Klons B3 hatten eine k_a von $6,02 \times 10^4$ und die des Klones H10 die niedrigste k_a mit $4,47 \times 10^4$ 1/Ms. Beim Klon H10 wurde zudem die höchste Dissoziationsrate (k_d) mit $1,23 \times 10^2$ M gemessen, was eine K_D der scFv-MS C5-Interaktion von $2,75 \times 10^{-7}$ M ergab. Die scFvs des Klones B3 zeigten eine K_D von $1,12 \times 10^{-7}$ M. Die höchste Affinität gegen MS C5 besaßen scFvs des Klons E10 mit einer K_D von $1,48 \times 10^{-8}$ M.

Klon	durchschnittliche k_a [1/Ms]	durchschnittliche k_d [1/s]	Durchschnittliche K_D [M]
B3	$6,02 \pm 2,55 \times 10^4$	$6,72 \pm 6,18 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-7}$
E10	$1,20 \pm 0,94 \times 10^5$	$5,64 \pm 1,39 \times 10^{-3}$	$1,48 \times 10^{-8}$
H10	$4,47 \pm 2,03 \times 10^4$	$1,23 \pm 0,20 \times 10^{-2}$	$2,75 \times 10^{-7}$

Tab. 6. Affinitäten und Bindungskinetiken von MS C5-Spezifischen scFvs.

Die Assoziations- (k_a) und Dissoziationsrate (k_d) der aufgereinigten scFvs wurde mittels **S**urface **P**lasmon **R**esonance im BIAcore bestimmt und die Dissoziationskonstante (K_D) wurde als Quotient k_a/k_d errechnet.

3.2.3 Inhibitor der Komplementaktivität

Die aufgereinigten MS C5-spezifischen scFvs wurden auf die Fähigkeit geprüft, die durch Aktivierung des Komplementsystems verursachte Lyse von sensibilisierten Schafserythrozyten im hämolytischen Test zu inhibieren. Dazu wurde zunächst die Menge von MS Serum, die eine 50%ige Lyse der eingesetzten Erythrozyten verursacht, mit 20,5 μ l einer 1:30 Verdünnung ermittelt. Anschließend wurde diese Menge MS Serum mit unterschiedlichen Konzentrationen an scFvs inkubiert und dann im hämolytischen Test eingesetzt. Wie in Abb. 11 dargestellt, konnten nur scFvs der Klone H10 und E10 nicht aber von Klon B3 das Komplementsystem in effektiver Weise in Abhängigkeit von der Dosis blockieren. Allerdings wurden die scFvs vom Klon B3 nur bis zu einer Konzentration von 120 μ g/ml ausgetestet, während von den Klonen H10 und E10 Konzentrationen von 400 μ g/ml bzw. 1,2 mg/ml eingesetzt werden konnten. Die inhibitorische Fähigkeit auf das Komplementsystem vom Klon H10 war höher als die des Klones E10. Während die Lyse der Schafserythrozyten bei einer Konzentration von 50 μ g/ml (1,8 μ M) scFvs des Klones H10 nahezu vollständig inhibiert wurde, wurden für Erreichung des gleichen Effekts von den scFvs E10 1,2 mg/ml (40 μ M) benötigt.

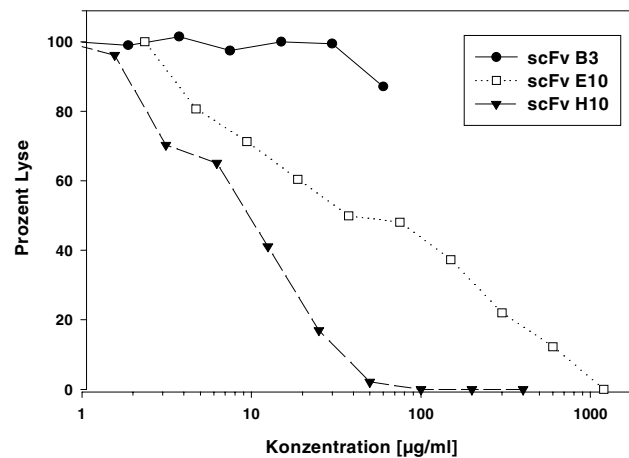


Abb. 11. Inhibition der Hämolyse durch MS C5-spezifische scFvs.

Die inhibitorische Aktivität von anti-MS scFvs wurde in einem hämolytischen Test überprüft unter Verwendung von sensibilisierten Schafserthrozyten und der Menge MS Serum, die die Menge Komplement für eine 50%ige Lyse enthält (CH50).

3.2.4 Konzentrationsbestimmung von C5 im MS Serum

Zur Konzentrationsbestimmung von C5 in MS Serum wurde ein Assay unter Verwendung der „Surface Plasmon Resonance“ Technik (SPR) im BIAcore eingesetzt. Dabei wurden aufgereinigte scFvs des MS C5-spezifischen Klon E10 an einen Sensorchip gekoppelt und die Response Units von 8 verschiedenen Konzentrationen an aufgereinigtem MS C5 zur Ermittlung einer Standardkurve gemessen. Für diese Messung wurden die Proben mit einer langsamen Flussrate von 5 µl/min über den Chip gegeben, um ein durch Massentransport kontrolliertes Binden des Analyten (MS C5) an den Liganden (E10) zu erzielen. Zwischen der eingesetzten C5 Konzentration (100 ng/ml bis 10 µg/ml) und den gemessenen Response Units wurde eine lineare Korrelation beobachtet (Abb. 12). Aus dem MS Serum wurde mit der gleichen Methode eine C5 Konzentration von $240 \pm 2,12$ µg/ml bestimmt. Da die untere Nachweisgrenze mit dieser Testmethode bei 100 ng/ml liegt, können also mindestens 0,04% der normalen C5 Konzentration im MS Serum nachgewiesen werden.

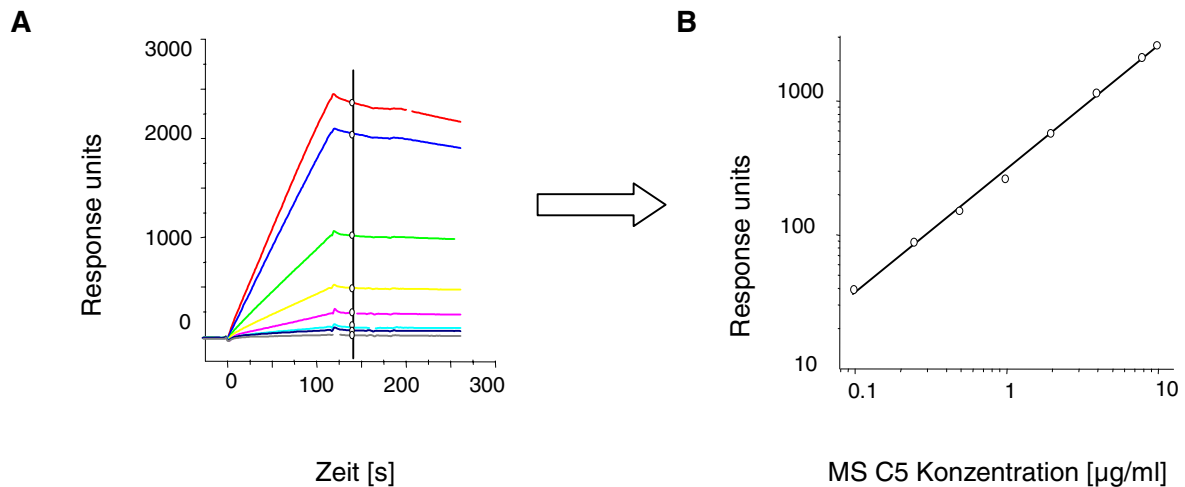


Abb. 12. Bestimmung der MS C5-Konzentration im Serum unter Verwendung der MS C5-spezifischen scFvs E10 in der Surface Plasmon Resonance Analyse (SPR).

(A) Acht unterschiedliche MS C5-Konzentrationen (100 ng/ml bis 10 µg/ml) wurden eingesetzt und die nach 140 Sekunden erreichten Response Units gemessen.

(B) Für eine Standardkurve wurden die durchschnittlichen Response Units aus 2 Messungen gegen die MS C5-Konzentration aufgetragen.

3.2.5 Detektion von MS C5-Ablagerungen im Gewebe nach heterotoper Herztransplantation von Ratte auf MS

Im Laufe dieser Arbeit wurde auch die Fähigkeit der aufgereinigten scFvs getestet, MS C5-Ablagerungen auf Rattenherzen nach Xenotransplantation in MS in der Immunhistochemie nachzuweisen. Rattenherzen wurden heterotop in MS transplantiert und für die Dauer von 30 Minuten reperfundiert. Makroskopisch zeigten die Herzen eine homogene Durchblutung nach Beendigung der vaskulären Anastomose. Am Ende der Reperfusion waren die Transplantate dunkelrot gefärbt, ein Zeichen der hyperakuten Abstoßungsreaktion. Die Färbung des abgestoßenen Gewebes mit den MS C5-spezifischen scFvs E10 und H10 ließ vaskuläre Ablagerungen von C5 erkennen (Abb. 13, A). Mit diesen Klonen wurde keine Kreuzreaktivität auf Herzgewebe nach syngener Transplantation von Ratte auf Ratte festgestellt (Abb. 13, B). ScFvs vom Klon B3 färbte sowohl endotheliale Strukturen des vom MS hyperakut abgestoßenen Rattenherzens als auch verschiedene Strukturen in Rattenherzen nach syngener Transplantation.

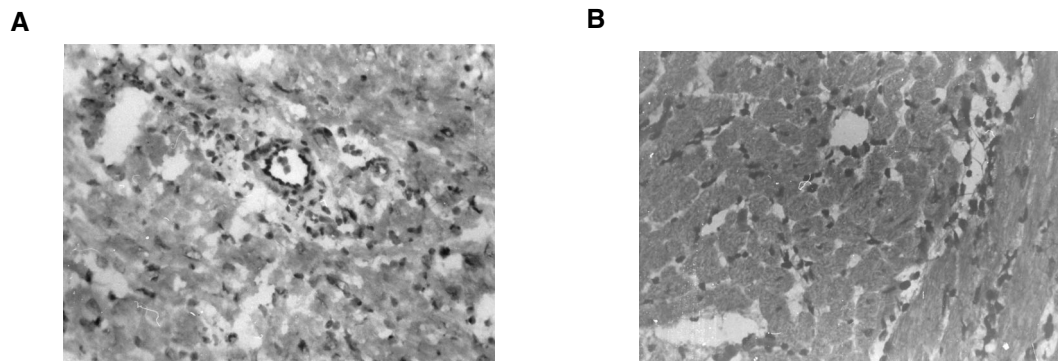


Abb. 13. Detektion von MS C5 in Rattenherzen nach Xenotransplantation.

(A) Diffuse vaskuläre MS C5-Ablagerungen wurden in einem xenogen perfundierten Rattenherzen unter Verwendung des scFvs E10 in der Immunhistochemie beobachtet.

(B) Kein MS C5 wurde in einem syngen transplantierten Rattenherz in der Immunhistochemie mit demselben scFv festgestellt.

3.3 Etablierung des Modells der diskordanten orthotopen Lebertransplantation (OLT)

Aufgrund von anatomischen und physiologischen Unterschieden zwischen MS und Ratte wurde die Technik der Lebertransplantation im Kleintiermodell in Kooperation mit Dr. Meyer zu Vilsendorf für die diskordante Anwendung weiterentwickelt. Der geringe Abstand zwischen supra- und infrahepatischer *V. cava* beim MS-Spender wurde durch Entnahme der Leber mit einem infrahepatischen Cavasegment ausgeglichen. Zusätzlich wurde die Technik der Größenreduzierten Lebertransplantation (Split-Leber-Transplantation) eingesetzt, um die größere Organmasse des Spenders auszugleichen.

3.3.1 Überleben und Physiologie der Transplantate nach OLT

Wie in Tab. 7 und Abb. 14 dargestellt, starben unbehandelte Lewis Ratten (Gruppe A) nach OLT im Mittel nach 3 Stunden (2 bis 4 Stunden). Eine Dekomplementierung mit CVF (Gruppe B) verlängerte das Überleben auf 5 (2 bis 10) Stunden (nicht statistisch signifikant). Bei beiden Gruppen kann das kurze Überleben auf die beobachtete inhomogene Reperfusion des Transplantats und eine verminderte Glukoneogenese im Empfänger zurückgeführt werden. Der Blutzucker der Ratten sank stetig und es wurde keine Normoglykämie erreicht. Auch durch die

intravenöse Zufuhr von Glukose konnte diese Hypoglykämie nicht ausgeglichen werden. Alle Tiere der Gruppe B zeigten innerhalb von 2 Stunden ein hepatisches Koma.

Wurde die MS Leber kurz vor der Organperfusion im dekomplementierten Empfänger mit dem Vasodilator Epoprostenol behandelt, überlebten die Tiere statistisch signifikant länger für 18 (11 bis 25) Stunden (Gruppe C, $p < 0,001$, Mann Whitney Test). Das Organ wurde nach der Transplantation schnell und homogen reperfundiert, es kam zu einer Wiederaufnahme der Glukoneogenese und die Tiere zeigten mindestens 10 Stunden lang einen normalen Blutzuckerspiegel.

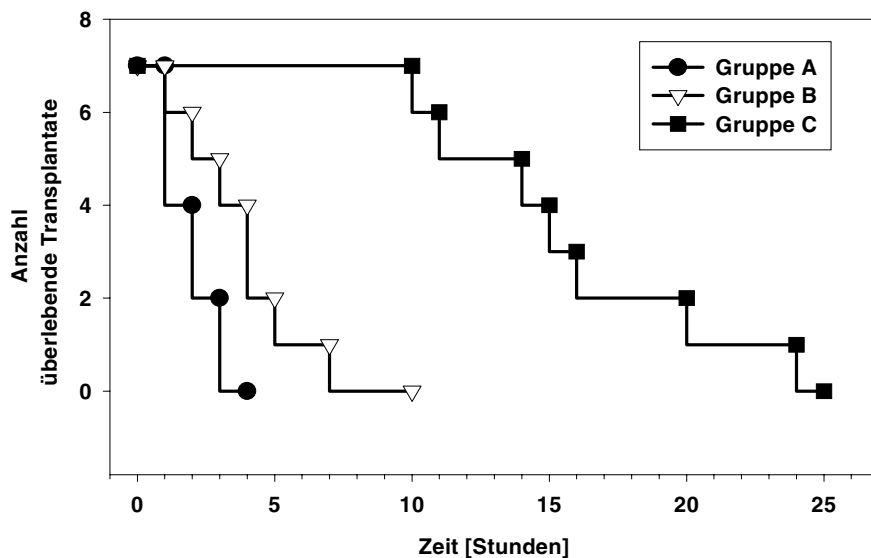


Abb. 14. Überleben nach Transplantation einer MS Leber auf Ratte.

Das Überleben der Empfänger, die nach Behandlung mit CVF ein mit Epoprostenol behandeltes Transplantat erhielten (Gruppe C), war mit 18 Stunden länger als bei Lebertransplantation ohne Behandlung (Gruppe A, 3 Stunden) oder alleiniger Behandlung mit CVF (Gruppe B, 5 Stunden).

Gruppe	n	Behandlung		Überleben		Immunhistologie				
		CVF	Epoprostenol	Median / Bereich	p	C3	IgM	MØ	NK	Tunel
A	6	Ø	Ø	3 (2-4) h		+++	+	-	-	n.b.
B	6	+	Ø	5 (2-10) h	Ns. vs. A	-	+	(+)	-	+
C	10	+	+	18 (11-25) h	< 0,001 vs. A,B	-	++	++	+	-

Tab. 7. Überleben und Immunhistologie der Lebertransplantate nach orthotoper Transplantation von Dunkin Hartley MS auf Lewis Ratten (OLT_X).

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Mann Whitney Tests. Die Stärke der humoralen Ablagerungen auf Endothelzellen und die Anzahl infiltrierender Zellen wurde semiquantitativ ausgewertet (von -,+,++ bis +++, n.b.:nicht bestimmt).

3.3.2 Apoptose und Immunhistologie der MS Leber nach OLT_X

Nach orthotoper Transplantation auf die Ratte wurden in der MS Leber die apoptotischen Kerne analysiert. Ohne Verwendung des Vasodilatators Epoprostenol waren 60 bis 80 Prozent der Hepatozytenkerne apoptotisch (Tab 7, Gruppe B, Abb. 15). Nach Verbesserung der Reperfusion durch Epoprostenol (Gruppe C) konnte bei weniger als 10 Prozent der Hepatozytenkerne Apoptose nachgewiesen werden (Abb. 15).

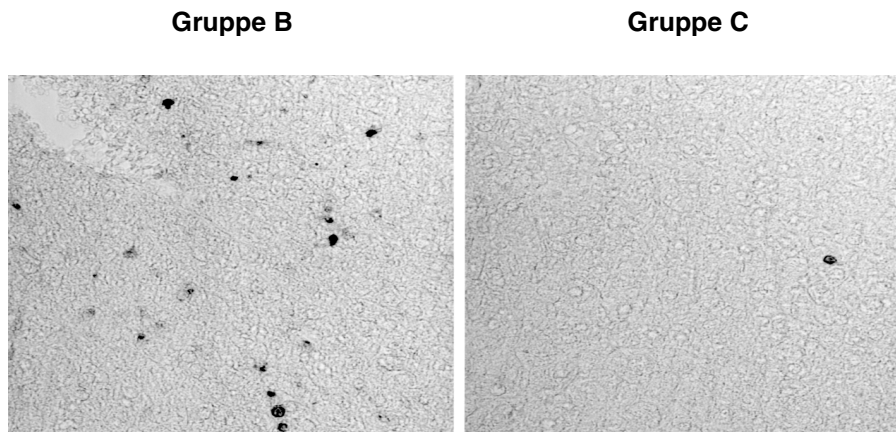


Abb. 15. Apoptotische Kerne in MS Leber nach Xenotransplantation.

Lebergewebe von jeder Versuchsgruppe wurde in Paraffin eingebettet und zur Bestimmung apoptotischer Zellen im TUNEL-Test eingesetzt. Zahlreiche TUNEL-positive Zellen wurden in CVF behandelten Tieren (Gruppe B) entdeckt, wohingegen nur einige wenige apoptotische Zellen nach einer Behandlung mit CVF und Epoprostenol beobachtet wurden (Gruppe C).

Wie in Abb. 16 dargestellt, zeigte die immunhistologische Untersuchung der abgestoßenen MS Leber bei den unbehandelten Lewis Ratten (Tab. 7, Gruppe A) eine starke C3-Ablagerung am Endothel, wohingegen nach Gabe von CVF (Gruppen B und C) kein C3 nachgewiesen werden konnte. Nur wenige xenoreaktive IgM Antikörper waren in abgestoßenen Transplantaten der Gruppen A und B zu finden, wohingegen in den abgestoßenen Transplantaten der Gruppe C starke IgM-Ablagerungen sichtbar waren. In dieser Gruppe konnte auch ein mononukleäres Infiltrat nachgewiesen werden, das hauptsächlich aus Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bestand. Makrophagen wurden in geringer Anzahl ebenfalls in den Transplantaten der Gruppe B entdeckt.

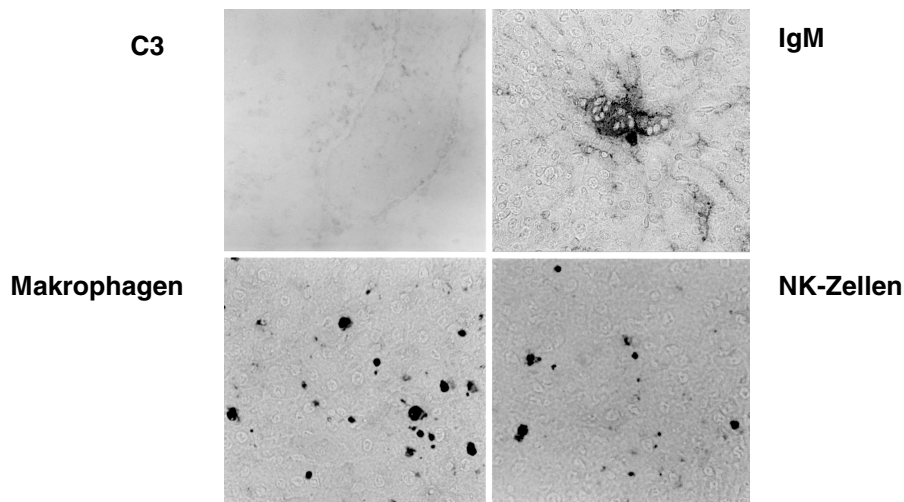


Abb. 16. Immunhistochemie der MS Leber nach Xenotransplantation.

Die immunhistologische Untersuchung der Lebertransplantate in Tieren, die CVF und Epoprostenol erhalten hatten (Gruppe C) zeigte keine Ablagerungen von C3, wohingegen starke Ablagerungen von anti-MS IgM-Antikörpern auftraten. Zusätzlich waren die Transplantate stark mit ED1-positiven Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) infiltriert.

3.4 Heterotopie Herztransplantation von MS auf Ratte (HHTX)

Zur Analyse der immunologischen Mechanismen bei der Abstoßung nach Xenotransplantation von MS auf Ratte wurde an Stelle der OLTX die chirurgisch weniger aufwendige heterotopie Herztransplantation (HHTX) durchgeführt. Um die Abstoßung zu überwinden, wurden verschiedene Behandlungsschemata wie B-Zellsuppression, transiente Depletion der NK-Zellen sowie Gabe von Donorantigen eingesetzt (vgl. Tab. 2, S. 74). Zur Überprüfung der B-Zellsuppression wurde zunächst ein ELISA zur Bestimmung zirkulierender anti-MS Antikörper (XNA: xenoreactive natural antibodies) in Ratten etabliert und in der Folge zur Detektion von präformierten und induzierbaren XNAs eingesetzt (vgl. 3.5). Zusätzlich wurden zur Kontrolle der immunsuppressiven Regime die Analyse zirkulierender B-Zellen durchgeführt (vgl. 3.6).

Die transiente Depletion der NK-Zellen wurde durch durchflußzytometrische Bestimmung analysiert und mit einer Gabe von Donor-Antigen in Form einer Infusion mit MS Leberzellen kombiniert (vgl. 3.7.1). Die Aktivität der regenerierten NK-Zellen gegenüber MS-Zellen wurde in einem Zytotoxizitätstest untersucht (vgl. 3.7.2). Um die Zirkulation oder Absiedlung der infundierten MS Leberzellen in Ratten zu überprüfen, wurde eine speziesspezifische RT-PCR etabliert (vgl. 3.8).

3.4.1 Überleben und Immunhistologie der MS Herzen nach heterotoper Transplantation auf Ratte

Zur Analyse der immunologischen Mechanismen bei der Abstoßung nach Xenotransplantation von MS auf Ratte sowie Überprüfung verschiedener Behandlungsschemata zu deren Überwindung wurde in Lewis und PVG/C6- Ratten ein MS Herz heterotop transplantiert (HHTX, vgl. Tab. 2). Als Abstoßungszeitpunkt wurde das Ende des tastbaren Herzschlages des Transplantates festgesetzt.

Wie in Tabelle 8 gezeigt, wird in unbehandelten Lewis-Ratten (Gruppe D) ein heterotop transplantiertes MS Herz hyperakut nach 13 Minuten (10 bis 18 Minuten) abgestoßen. Das Transplantat zeigte in der Immunhistologie starke Ablagerungen von C3 und nur wenige IgM-Ablagerungen. Nach Behandlung mit CVF kommt es erst nach 17,5 Stunden (6 bis 40 Stunden) zur Transplantatabstoßung (Gruppe E). Entsprechend wurden in der Immunhistologie keine C3-Ablagerungen dafür aber starke IgM-Ablagerungen und eine Infiltration mit Makrophagen und NK-Zellen nachgewiesen (Abb. 18). Wurde die terminale Komplementkaskade von C5b bis C9 und damit die Bildung des Membran Angriff Komplexes (MAC) inhibiert, wie in PVG/C6- Ratten (Gruppe I), so überlebte das Organ 14 Stunden (8 bis 24 Stunden). Immunhistologisch wurden hier wie bei den nicht dekomplementierten Lewis Ratten der Gruppe D massive C3-Ablagerungen detektiert. Daneben wurden auch starke IgM-Ablagerungen und Infiltration mit Makrophagen und NK-Zellen beobachtet.

Die Transplantatabstoßung in Lewis Ratten mit B-Zell-Suppression durch die Kombination von Splenektomie und täglicher Gabe des Leflunomid Derivates Malonitrylamid (MNA) (Gruppe F) erfolgte ähnlich wie in Gruppe D nach 24 Minuten (19 bis 35 Minuten). Wie in Gruppe D zeigte sich in der immunhistologischen Analyse des Transplantats eine massive Ablagerung von C3. Die Kombination von B-Zell-Suppression, Splenektomie und Komplementinhibition (Gruppe G) dagegen führt zu einem signifikanten Anstieg des Transplantatüberlebens auf 47 Stunden (12 bis 168 Stunden). In der Histologie zeigen die Transplantate keine C3- und IgM-Ablagerungen aber eine starke Infiltration mit Makrophagen und NK-Zellen.

		Behandlung				Überleben	Immunhistologie			
Gruppe	n	C6-	CVF	B-Zell Inhibition	LCI Anti-NK	Median/ Bereich	C3	IgM	MØ	NK
D	6	-	-	-	-	13 (10-18) min	+++	+	-	-
E	15	-	+	-	-	17,5 (6-40) h	-	+++	+++	++
F	20	-	-	+	-	24 (19-35) min	+++	-	-	-
G	6	-	+	+	-	47 (12-168) h	-	-	+++	++
H	5	-	+	+	+	78,6 (48-138) h	-	+	+++	-
I	6	+	-	-	-	14 (8-24) h	+++	+++	++	++
K	5	+	+	+	+	103 (19-224) h	-	+	+++	-
L	4	+	-	+	+	33 (26-48) h	+++	+	+++	-

Tab. 8. Auswirkung verschiedener Behandlungsschemata auf die Transplantatabstoßung nach heterotoper Herztransplantation (HHTX).

Die Stärke der humoralen Ablagerungen auf Endothelzellen und die Anzahl infiltrierter Zellen wurden semiquantitativ ausgewertet (von -,+,++ bis +++).

Die Tiere der Gruppen H, K und L (Tab. 2, S. 74) wurden mit einer Kombination aus B-Zell- und T-Zellsuppression, transients Depletion der NK-Zellen und Gabe von Donor-Antigen behandelt. In dekomplementierten Lewis Ratten, die das gesamte Behandlungsschema inklusive intraportaler MS Leberzellinfusion unter CVF erhielten, wurde ein verlängertes Transplantatüberleben von 78,6 Stunden (48 bis 138 Stunden) erreicht (Gruppe H, Tab. 7 und Abb. 17). Damit konnte das Transplantatüberleben im Vergleich zu Gruppe G ohne Leberzellinfusion und Depletion der NK-Zellen (47 Stunden) verdoppelt werden. Bemerkenswert ist, dass in den Transplantaten in der Immunhistologie keine NK-Zellen zu finden waren jedoch eine starke Infiltration mit Makrophagen (Abb. 18).

In PVG/C6- Ratten (Gruppen K und L) wurde das Transplantat nach 103 Stunden (19 bis 224 Stunden, Gruppe K) bzw. nach 33 Stunden (26 bis 48 Stunden, Gruppe L) abgestoßen (Tab. 7 und Abb. 17). Auch bei den Gruppen K und L wurde wie bei der Gruppe H im Transplantat keine Infiltration mit NK-Zellen dafür aber viele Makrophagen gefunden. Auffällig ist zudem die starke Ablagerung von C3 in den von PVG/C6- Ratten aus Gruppe L abgestoßenen Transplantaten. In diesen Transplantaten konnte auch eine Ablagerung von C6 und C9 in der Immunhistologie beobachtet werden.

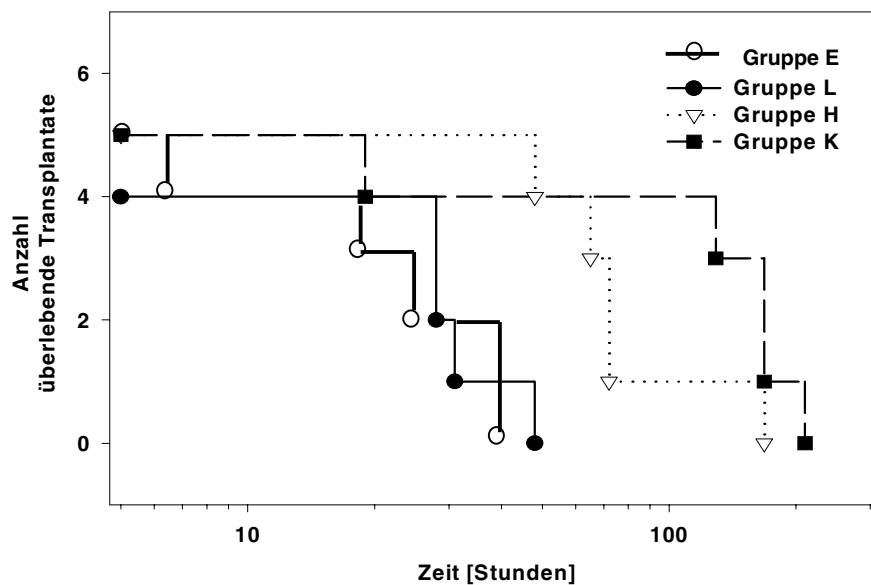


Abb. 17. Überleben von heterotop auf Ratte transplantierten MS Herzen.

In mit CVF dekomplementierte Lewis Ratten (Gruppe E) transplantierte MS Herzen überlebten 17,5 Stunden. Durch vorherige Behandlung der Lewis Tiere mit einer Kombination aus B- und T-Zellsuppression, transienter NK-Zell-Depletion und Gabe von Donor-Antigen (Gruppe H) wurde das Transplantatüberleben auf 78,6 Stunden verlängert. Das gleiche Behandlungsschema führte in Komplement-defizienten PVG/C6- Ratten (Gruppe L) zu einer Abstoßung des Transplantates nach 33 Stunden. Erst durch zusätzliche Dekomplementierung mit Hilfe von CVF der C6-defizienten Empfänger (Gruppe K) konnte ein verlängertes Transplantatüberleben von 103 Stunden erzielt werden.

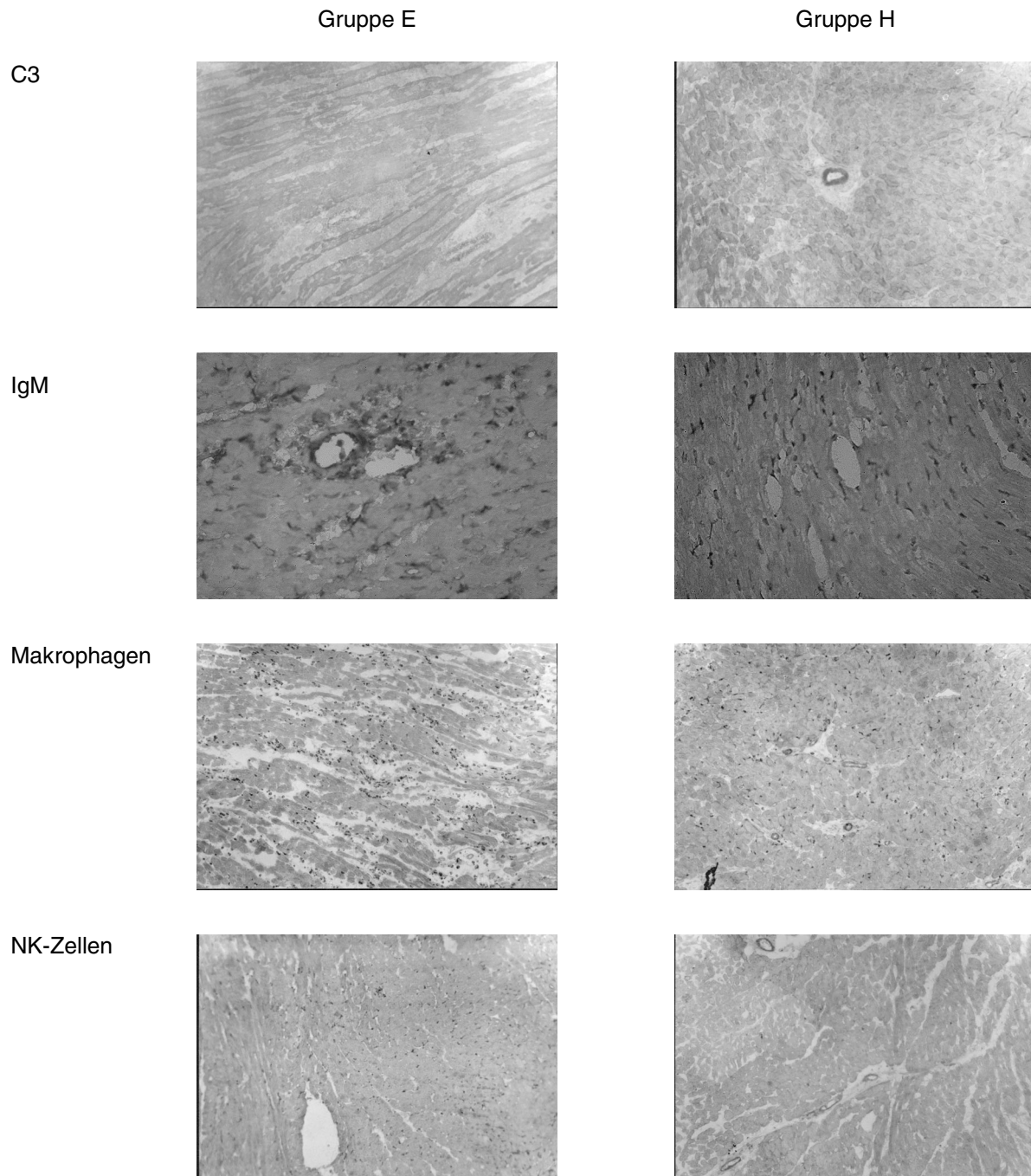


Abb. 18. Immunhistologie der abgestoßenen MS Herzen nach Transplantation auf Lewis Ratten der Gruppen E und H.

Die Transplantate der mit C566 dekomplementierten Lewis Tiere (Gruppe E) zeigten keine C3-Ablagerungen aber IgM-Ablagerungen und Infiltration mit Makrophagen und NK-Zellen. Wurden die Tiere mit einer Kombination aus B- und T-Zellsuppression, transienter NK-Zell-Depletion, Donor-Antigen-Gabe und Dekomplementierung behandelt (Gruppe H), wurden in den abgestoßenen MS Herzen im Vergleich zu Gruppe E keine NK-Zell-Infiltrate festgestellt.

3.4.2 Densiometrische Analyse der Infiltration mit Makrophagen und NK-Zellen in abgestoßenen MS Herzen

Wie in Abb. 19, A dargestellt, zeigten die von dekomplementierten Lewis Ratten (Gruppe E) bzw. von Komplement-defizienten PVG/C6- Ratten (Gruppe I) abgestoßenen MS Herzen eine Infiltration mit $161,2 \pm 25,2$ bzw. $150,8 \pm 14,8$ Makrophagen/mm². Wurden Lewis Tiere mit einer Kombination aus B- und T-Zellsuppression, transientser NK-Zell-Depletion und Donor-Antigen-Gabe behandelt (Gruppe H), waren signifikant weniger Makrophagen im Transplantat vorhanden als in Gruppe E ($79,2 \pm 11,6$ /mm², Student' t-Test $p < 0,05$). Wurden PVG/C6- Ratten mit dem gleichen Regime behandelt (Gruppen K und L), wies das MS Herz nach Abstoßung $122,5 \pm 21,7$ Makrophagen/mm² auf (Gruppe L) oder bei zusätzlicher Gabe von CVF im Vergleich zu den unbehandelten PVG/C6- Tieren der Gruppe I eine signifikant kleinere Anzahl von $90,8 \pm 12,4$ Makrophagen/mm² (Gruppe K, Student's t-Test $p < 0,05$).

Die densiometrische Auswertung der infiltrierten NK-Zellen ergab bei den dekomplementierten Lewis Ratten (Gruppe E) $92,02 \pm 15,2$ /mm² (Abb. 19, B). In den Transplantaten der unbehandelten PVG/C6- Tiere (Gruppe I) wurden mehr NK-Zellen festgestellt ($140,04 \pm 11,4$ /mm²). Die Behandlung mit B- und T-Zellsuppression, transientser Depletion der NK-Zellen und Gabe von Donor-Antigen führte zu einer signifikanten Reduktion der infiltrierten NK-Zellen auf $0,8 \pm 0,2$ /mm² bei Lewis Ratten (Gruppe H, Student's t-Test $p < 0,05$). Auch bei den PVG/C6- Ratten wurden die NK-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren der Gruppe I signifikant reduziert. (Gruppe L: $4,2 \pm 1,2$ /mm² und Gruppe K: $1,2 \pm 0,7$ /mm², Student's t-Test, $p < 0,05$).

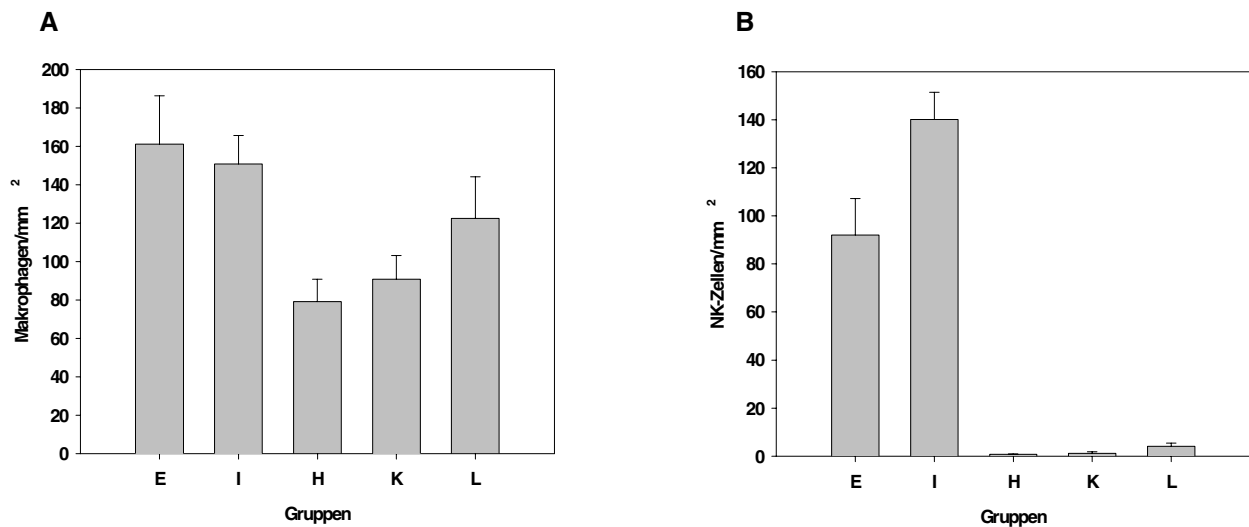


Abb. 19. Infiltration der abgestoßenen MS Herzen mit Makrophagen (A) und NK-Zellen (B) nach HHTX. Die abgestoßenen MS Herzen aus den dekomplementierten Lewis Ratten (Gruppe E), aus unbehandelten PVG/C6-Ratten (Gruppe I), sowie den mit einer Kombination aus B- und T-Zellsuppression, transienter NK-Zell-Depletion und Donor-Antigen-Gabe behandelten, dekomplementierten Lewis Tieren (Gruppe H) und den PVG/C6-Tieren mit (Gruppe K) und ohne Dekomplementierung (Gruppe L) wurden immunhistochemisch angefärbt und die Infiltration mit Makrophagen (A) bzw. NK-Zellen (B) densitometrisch ausgewertet.

3.5 Analyse von xenoreaktiven natürlichen Antikörpern (XNA)

Um gegen MS Antigene gerichtete, xenoreaktive natürliche Antikörper (XNA) im Rattenserum zu analysieren, wurde in Anlehnung an die von Leventhal et al. (1992b) beschriebene Methode ein ELISA entwickelt. Als Antigene wurden Membranextrakte aus MS Thrombozyten, Milz- und Leberzellen und aus Zellen der fibroblastenartigen MS Zelllinie JH4 präpariert und in ELISA und Immunblot unter Verwendung von Seren unbehandelter Tiere miteinander verglichen. Der entwickelte ELISA wurde weiterhin zur Überprüfung der XNA-Spiegel in Ratten im Verlauf verschiedener Behandlungsschemata eingesetzt.

3.5.1 Präparation von Membranextrakten aus MS-Zellen

Aus verschiedenen primären MS Zellen, wie Leber- und Milzzellen, Thrombozyten sowie aus der MS Zelllinie JH4 wurden Membranextrakte präpariert und zur Analyse von XNA eingesetzt. Die Proteinbestimmung der Membranextrakte ergab unter Verwendung der Organe eines MS (ca. 600 g) etwa 70 mg aus Leberzellen, 7 mg aus Milzzellen und nur 2 mg Extrakt aus Thrombozyten. Der Extrakt aus 1×10^7 Zellen der JH4 Zelllinie enthielt 2,5 mg Protein.

3.5.2 Analyse von XNA in unbehandelten Lewis und PVG/C6- Ratten im ELISA

Um die Eignung der Membranextrakte aus verschiedenen primären MS Zellen (Leber, Milz, Thrombozyten) und aus der Zelllinie JH4 als Antigene zur Detektion von anti-MS Antikörpern zu testen, wurden Seren von je 10 unbehandelten Lewis Ratten und PVG/C6- Ratten in seriellen Verdünnungen (1:2 bis 1:256) im ELISA getestet. Dabei zeigte es sich als unabdingbar, die einmal getauten Membranextrakte nicht weiter zu verwenden. Wurden die Antigenpräparationen mehrmals aufgetaut, zeigte das Rattenserum einen deutlichen Reaktivitätsverlust. Der Nachweis von IgM XNA eines individuellen Serums ergab bei jedem Membranextrakt eine fast lineare Titration der eingesetzten Verdünnungen (Abb. 20). Bei Verwendung der Membranextrakte aus MS Leber- oder Milzzellen konnten xenoreaktive IgG Antikörper mit einer linearen Titration zwischen der Serumverdünnung 1:2 und 1:32 detektiert werden. Andererseits lagen die ELISA Signale der IgG XNA gegen Membranextrakte aus Thrombozyten oder aus der JH4 Zelllinie nur knapp über dem Hintergrund.

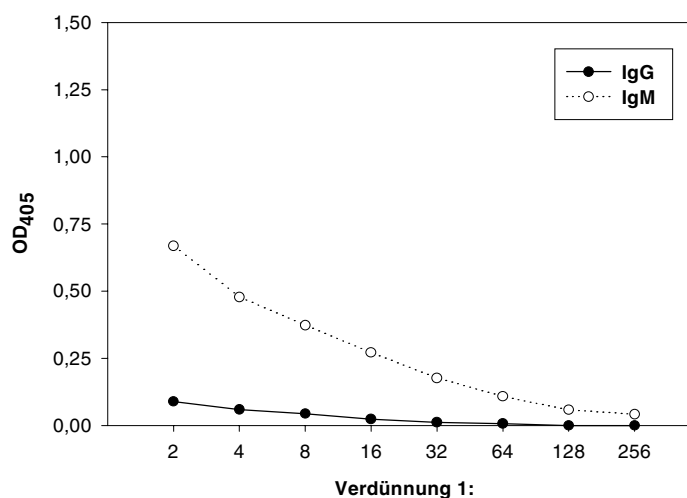


Abb. 20. Xenoreaktive IgG und IgM Antikörper eines PVG/C6- Serums gegen Membranextrakte der MS Zelllinie JH 4 im ELISA.

Um die Reaktivität der einzelnen Seren zu vergleichen, wurden die bei der höchsten Verdünnungsstufe (1:2) gemessenen OD-Werte herangezogen. Generell lagen bei allen Seren die ELISA Signale für IgM etwa 5 bis 20 mal höher als die der IgG XNA.

Die Reaktivität der anti-MS Antikörper variierte stark in Abhängigkeit vom verwendeten Antigen. Gegen die Membranextrakte von Milzzellen zeigten die IgM XNA aus Lewis Seren signifikant niedrigere ELISA Signale als gegen alle anderen Zelltypen (Student' t-Test $p \leq 0,001$, Abb. 21, A). Die durchschnittlichen OD-Werte gegen JH4 lagen bei $0,45 (\pm 0,17)$, gegen Leberzellen bei $0,53 (\pm 0,09)$, gegen Thrombozyten bei $0,41 (\pm 0,1)$ und gegen Milzzellen nur bei $0,20 (\pm 0,09)$. Xenoreaktive IgM Antikörper in Seren von PVG/C6- Ratten zeigten gegen den Extrakt aus der JH4 Zelllinie signifikant höhere Reaktivität als gegen die Präparationen aus den primären Zellen (Student's t-Test $p \leq 0,001$, Abb. 21, B). Während im Mittel gegen JH4 ein ELISA Signal von $1,15 (\pm 0,29)$ erreicht wurde, lag die durchschnittliche OD gegen Thrombozyten bei $0,69 (\pm 0,26)$, gegen Milzzellen bei $0,43 (\pm 0,14)$ und gegen Leberzellen nur bei $0,33 (\pm 0,14)$.

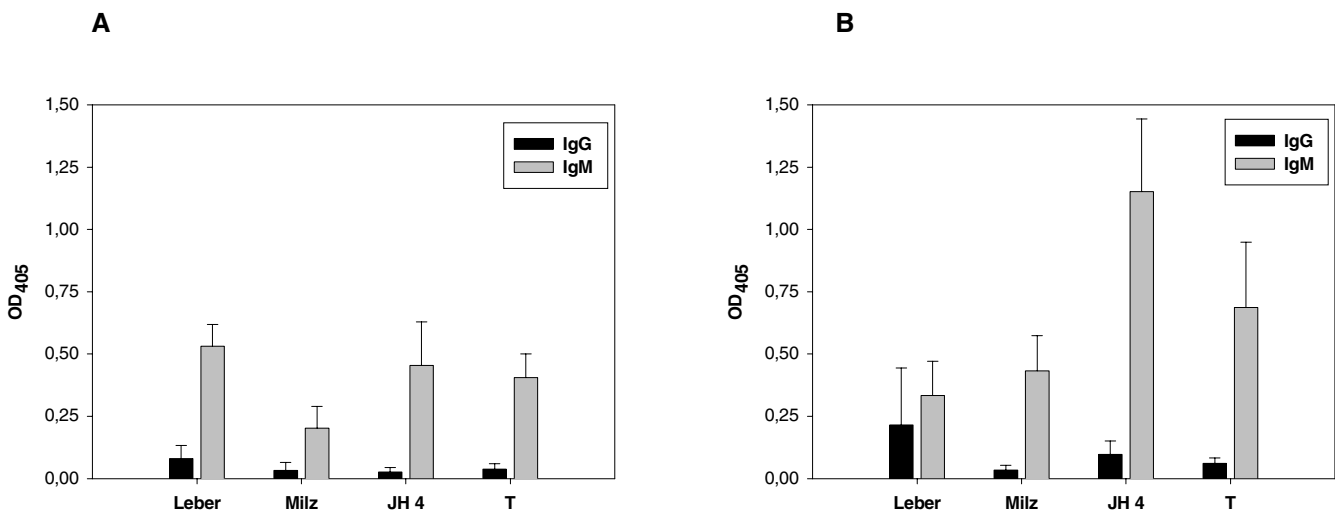


Abb. 21. Xenoreaktivität der XNA von Lewis (A) und PVG/C6- Ratten (B) im ELISA.

Die IgG- und IgM-Antworten von 10 individuellen Lewis (A) und PVG/C6- Ratten (B) gegen Membranextrakte von MS Thrombozyten (T), Leber- und Milzzellen sowie der JH4 Zellen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Der Vergleich 10 individueller Seren von Lewis oder PVG/C6- Ratten zeigte eine große interindividuelle Variabilität hinsichtlich der Xenoreaktivität gegen alle getesteten Membranextrakte, wie beispielhaft in Abb. 22 mit den Seren der PVG/C6- Ratten gegen die Präparation aus der JH4 Zelllinie gezeigt. Die von den IgG bzw. IgM XNA erzielten OD-Werte zeigten hierbei eine Spannweite von 0,04 bis 0,23 bzw. von 0,67 bis 1,58. Die Reihenfolge hinsichtlich der von den getesteten Individuen erzielten Signalstärken variierte zudem in Abhängigkeit vom verwendeten Membranextrakt sowohl bei Lewis als auch bei den PVG/C6-Ratten.

Die getesteten Rattenstämme zeigten eine unterschiedliche Reaktivität der IgM XNA (Abb. 21). Während die durchschnittlichen ELISA Signale der 10 individuellen PVG/C6- Ratten signifikant höher waren als die der Lewis Ratten bei Einsatz der Präparationen aus der JH4 Zelllinie ($p \leq 0,001$), aus Milzzellen ($p \leq 0,001$) oder Thrombozyten ($p = 0,005$), war dies bei Leberzellen nicht der Fall (jeweils Student's t-Test).

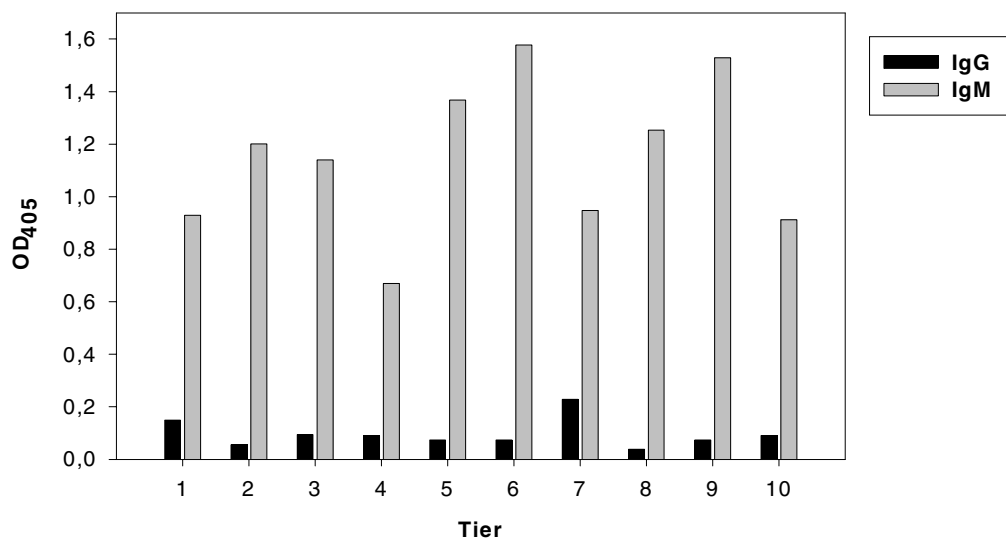


Abb. 22. Xenoreaktivität der IgG und IgM XNA von 10 individuellen PVG/C6- Ratten im ELISA gegen den Membranextrakt der JH4 Zelllinie.

3.5.3 Analyse der von unbehandelten Ratten erkannten MS Antigene im Immunblot

Im Immunblot wurden die Antigenmuster der verschiedenen Membranpräparationen aus primären MS Zellen (Leber, Milz und Thrombozyten) sowie der Membranextrakte aus der JH4 Zelllinie untersucht, die von individuellen Seren unbehandelter Lewis und PVG/C6-Ratten erkannt wurden. Sowohl IgG als auch IgM XNA detektierten zahlreiche Banden in den individuellen Membranextrakten (Abb. 23). Beide Isotypen interagierten mit Proteinen desselben Molekulargewichts. Alle Seren beider getesteten Rattenstämme erkannten dasselbe Antigenmuster auf einem bestimmten Membranextrakt. Unterschiede wurden nur hinsichtlich der Intensität der Anfärbung festgestellt.

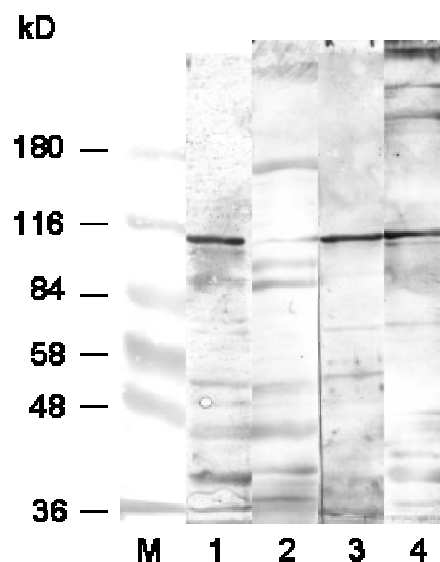


Abb. 23. Xenoreaktivität von XNA im Immunblot.

Alle individuellen Seren der Lewis und PVG/C6-Ratten zeigten dieselben Ergebnisse. IgG XNA erkannten dieselben Banden wie IgM XNA, wenn auch mit schwächerer Signalstärke. Als Beispiel ist die Reaktivität eines individuellen Lewis Serums gegen Membranextrakte der JH4 Zelllinie (Spur 1), Leber- und Milzzellen (Spuren 2 und 3) sowie Thrombozyten (Spur 4) gezeigt. M: Marker prestained.

Die anti-MS Antikörper in Rattenserum detektierten jedoch Proteine unterschiedlicher Größe in Abhängigkeit vom verwendeten Membranextrakt. Insbesondere die von Leberzellen exprimierten Antigene unterschieden sich deutlich von denen der JH4 Zellen, Thrombozyten und Milzzellen. Während IgG und IgM XNA Banden über 180 kD oder zwischen 116 und 180

kD bei Verwendung von Membranextrakten aus Thrombozyten oder Leberzellen erkannten, lag in Extrakten der JH4 Zelllinie oder Milzzellen die Bande mit dem höchsten Molekulargewicht bei etwa 116 kD. Zudem war den Extrakten der JH4 Zellen, Thrombozyten und Milzzellen eine Proteinbande auf der Höhe zwischen 58 und 84 kD gemein, die bei Leberzellen nicht auftrat.

3.5.4 Einfluss verschiedener Behandlungsschemata auf zirkulierende XNA

Um die Auswirkungen verschiedener Behandlungsschemata (z.B. Gabe von MS Hepatozyten, B-Zellsuppression) auf die gegen MS Antigen gerichteten XNA im Rattenserum zu analysieren, wurden die von einer 1:2 Serumverdünnung erzielten ELISA-Signale bestimmt, wobei der vom individuellen Serum vor jeglicher Behandlung erreichte Wert als Bezugsgröße diente.

Zur Untersuchung des Einflusses der B-Zellsuppression auf die XNA-Spiegel im Serum wurden je 2 PVG/C6-Ratten mit einer täglichen Gabe von 10 mg/kg bzw. 20 mg/kg Leflunomid behandelt. Bei einer Dosierung von 10 mg/kg sanken die XNA vom IgM Isotyp 3 bzw. 7 Tage nach Behandlungsbeginn auf 64% (± 2) bzw. 55,5% ($\pm 0,5$) des Ausgangswertes ab (Abb. 24). Eine Verdopplung der Dosis auf 20 mg/kg führte zu einer Reduktion auf 81,5% ($\pm 6,5$) am Tag 3 und 62% (± 2) am Tag 7.

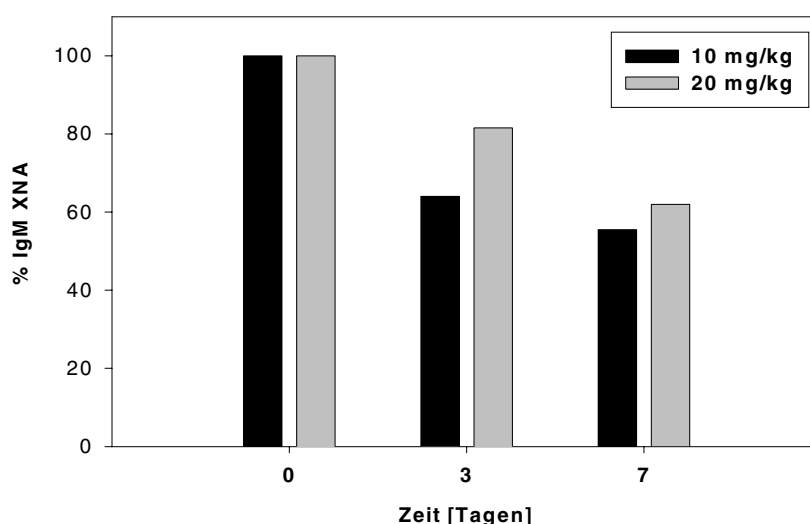


Abb. 24. XNA nach B-Zellsuppression.

Je 2 PVG/C6 Ratten wurden täglich mit 10 oder 20 mg/kg des B-Zellsuppressivums Leflunomid behandelt und die IgM XNA im ELISA gegen Membranextrakte von MS Leberzellen bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte.

Um den Einfluss einer Gabe von MS Antigen auf die XNA in Rattenserum zu überprüfen, wurde 10 Lewis Ratten unter Dekomplementierung mit CVF jeweils 1×10^7 MS Leberzellen in die Pfortader appliziert (vgl. Tab. 3, S. 76, Gruppe M). Nach einer minimalen Reduktion kurz nach der Leberzellinfusion kam es zu einem starken Anstieg der XNA, der im Falle der IgG Antikörper verzögert aber dann umso deutlicher ausfiel (Abb. 25, A). Im Mittel waren die IgM XNA 3 Stunden nach der Leberzellgabe um etwa 40% (± 10) reduziert, erreichten am Tag 1 in etwa ihren Ausgangswert ($109\% \pm 17$) und stiegen am Tag 3 auf fast das 5-fache ($484\% \pm 87$) und am Tag 7 auf etwa das 6,5-fache ($644\% \pm 13$) an (Abb. 25, A). Nach einer weiteren Woche (Tag 14) sanken die IgM Werte wieder auf 384% des Ausgangswertes (± 40).

Die IgG XNA waren 3 Stunden nach Leberzellgabe um etwa 12% ($\pm 7,4$) reduziert (Abb. 25, A). Diese Reduktion hielt bis zum Tag +3 an, erst am Tag +7 wurde das 4,8-fache des Ausgangswertes erreicht ($475\% \pm 95$). An den Tagen +14 bzw. +21 erhöhte sich die IgG-Antwort auf 3700% (± 476) bzw. 4700% (± 512).

Zur Analyse der Auswirkung von MS Leberzellinfusion unter vorheriger Splenektomie und B-Zellsuppression auf die XNA wurden 4 männliche Lewis Ratten am Tag -10 splenektomiert und täglich mit dem Leflunomid-Derivat Malonitrylamid (MNA) behandelt (vgl. Tab. 3, S. 76, Gruppe N). Unter Dekomplementierung mit CVF erhielten die Tiere dann eine Infusion von MS Leberzellen in die Pfortader. Die Entfernung der Milz und die tägliche Gabe von MNA führte zu einer signifikanten Reduktion der IgM XNA, die auch durch eine Infusion mit MS Hepatozyten nicht durchbrochen wurde (Abb. 25, B, Student's t-Test $p < 0,001$). Bereits 5 Tage nach Splenektomie und Beginn der B-Zellsuppression (Tag -5) waren die IgM Antikörper im Mittel um 70% (± 2) reduziert. Weitere 4 Tage später (Tag -1) wurde eine Reduktion um 74% ($\pm 2,7$) festgestellt. Nach Leberzellgabe waren im Schnitt zu allen getesteten Zeitpunkten (+3 Stunden, Tag +1, +3 und +7) etwa 20% der ursprünglich vorhandenen IgM XNA noch nachweisbar.

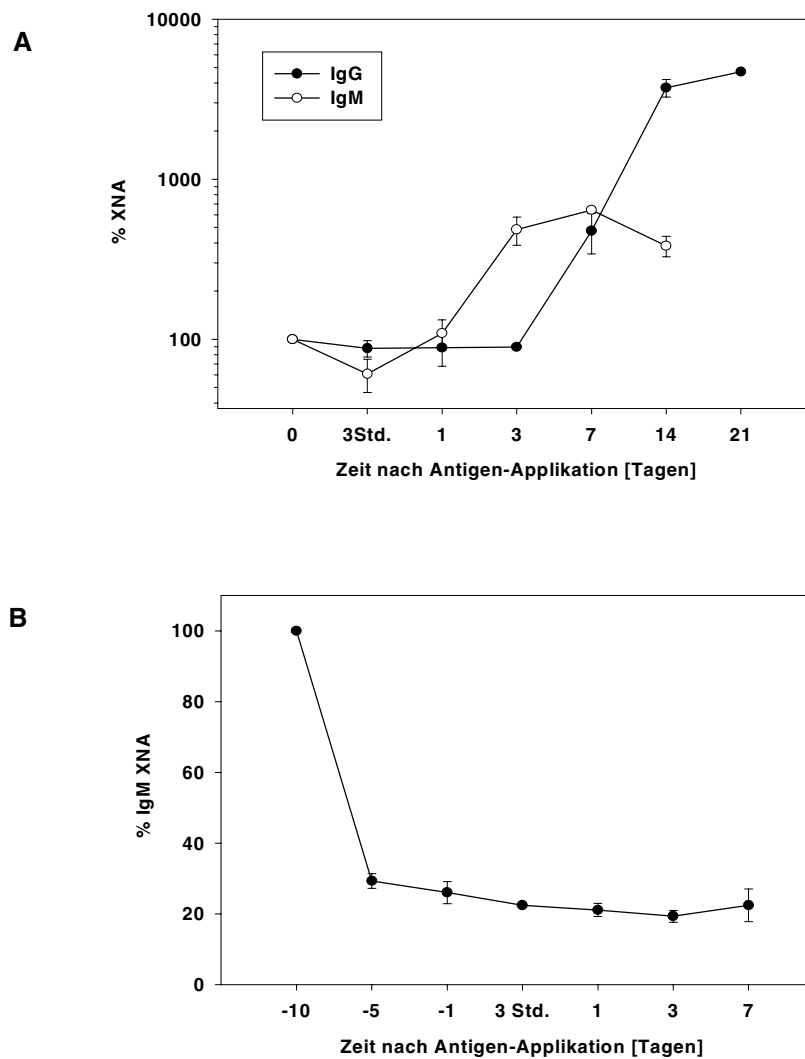


Abb. 25. XNA-Spiegel in Prozent nach Infusion mit Donorantigen ohne (A) und mit vorheriger Splenektomie und B-Zellsuppression (B).

(A) Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der IgG- und IgM-Antworten von 10 Lewis Ratten nach intraportaler Infusion mit MS Leberzellen.

(B) Vier Lewis Ratten wurden am Tag -10 splenektomiert, täglich mit dem B-Zellsuppressivum Malonitrylamid (10 mg/kg) behandelt und bekamen am Tag 0 eine Infusion mit MS Leberzellen. Gezeigt sind die im ELISA erzielten, Mittelwerte der IgM-Antworten \pm Standardabweichung.

Als Antigen wurden im ELISA Membranextrakte aus MS Leberzellen verwendet.

Mittels ELISA wurden auch die IgG- und IgM XNA-Spiegel in Lewis und PVG/C6- Ratten analysiert, die mit einer Kombination aus Splenektomie, B- und T-Zellsuppression, MS Leberzellinfusion und transienter Depletion der NK-Zellen vor einer heterotopen Herztransplantation behandelt wurden (vgl. Tab 2, S. 74, Gruppen H, K und L). Sechs Tage nach Splenektomie und Beginn der B-Zellsuppression (Tag -15) waren die IgM XNA der Lewis Ratten (Gruppe H) im Mittel bereits um über 80% auf 12,7% (von 11,3 bis 17%) signifikant reduziert (ANOVA Test on Ranks, Dunn's Methode $p < 0,05$, Abb. 26, B). Diese Abnahme der IgM XNA wurde bis zum Tag -1 vor Herztransplantation noch auf 90% verstärkt (9,1%, von 7,1 bis 14,8%). Nach Abstoßung war bei den Lewis Ratten nur noch ein IgM XNA-Spiegel von 0,35% (von 0 bis 0,7%) messbar. Auch bei den PVG/C6- Ratten sanken im Laufe der Behandlung die IgM XNA. Nach Splenektomie und 6-tägiger B-Zellsuppression waren die XNA vom IgM Isotyp der mit 10 mg/kg Leflunomid behandelten PVG/C6- Ratten (Gruppe K) um etwa 80% auf einen Mittelwert von 19,7% (von 15,9 bis 29,7%) und die IgM XNA der PVG/C6- Ratten mit der doppelten Dosis Leflunomid (Gruppe L) um etwa 83% auf 17,1 (von 10,5 bis 22,1%) signifikant reduziert (ANOVA Test on Ranks, Dunn's Methode $p < 0,05$, Abb. 25, B). Die anti-MS Antikörper vom IgM Isotyp sanken bei den PVG/C6- Ratten der Gruppen K bzw. L einen Tag nach Leberzellinfusion (Tag -13) auf einen Median von 17,2% (von 7,5 bis 26,8%) bzw. auf 11,8% (von 10,3 bis 13,2%). Einen Tag vor Herztransplantation (Tag -1) war der IgM XNA-Spiegel der Tiere der Gruppen K bzw. L höher als in den korrespondierenden Lewis Ratten (Gruppe H), nämlich 14,7% (von 11,8 bis 20,5%) bzw. 17,7% (von 11,7 bis 35%) des Ausgangswertes im Vergleich zu 9,1% (von 7,1 bis 14,8%) bei den Lewis Ratten (statistisch nicht signifikant). Nach der Abstoßung lagen die IgM XNA Spiegel der PVG/C6- Ratten der Gruppen K bzw. L im Mittel bei 6,9% (von 3,4 bis 10,2%) bzw. bei 9,7% (von 4,8 bis 18%) IgM XNA und waren damit signifikant niedriger als bei den Lewis Tieren der Gruppe H zu diesem Zeitpunkt (Mann Whitney Test $p < 0,05$).

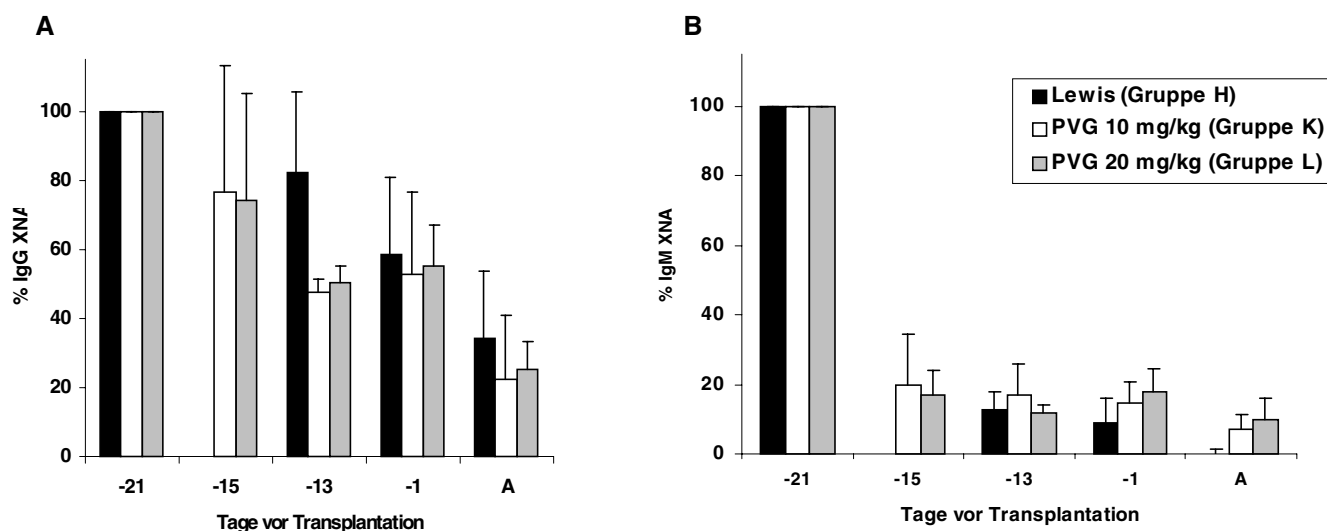


Abb. 26. XNA vom IgG-(A) und IgM-Isotyp (B) in den Lewis Ratten der Gruppe H und PVG/C6- Ratten der Gruppen K und L.

Gezeigt sind die im ANOVA on Ranks ermittelten Mediane \pm Bereich (von.. bis..) der IgG- (A) und IgM-Antworten (B) \pm Standardabweichungen von Lewis Ratten (Gruppe H) und PVG/C6- Ratten (Gruppen K und L), die nach Splenektomie und Start der B-Zellsuppression am Tag -21 (bei Gruppe L doppelte Dosis), nach zusätzlicher T-Zellsuppression ab Tag -15 eine Infusion mit MS Leberzellen bekamen (Tag -14), wobei die Lewis Tiere dekomplementiert wurden. Am Tag -13 wurden die NK-Zellen der Tiere durch Gabe des anti-asialo GM1 Serums transient depletiert. Eine heterotope Transplantation eines MS Herzens wurde am Tag 0 durchgeführt, wobei die Lewis Tiere (Gruppe H) zusätzlich durch CVF dekomplementiert wurden. Die Lewis und PVG/C6- Tiere der Gruppe K erhielten nach Transplantation jeden 2. Tag CVF, um das Komplementsystem dauerhaft zu inhibieren. Die statistische paarweise Auswertung der XNA-Spiegel zu den unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte mit der Dunn's Methode des ANOVA on Ranks Tests.

Die XNA vom IgG Isotyp sanken bei den Tieren der Gruppen H, K und L kontinuierlich im Laufe der Behandlung (Abb. 26, A). Am Tag -15 waren die IgG Antikörper der Lewis Ratten (Gruppe H) um 24% auf einen Mittelwert von 82,2% (von 78,7 bis 90,6%) reduziert. Vor der Herztransplantation (Tag -1) sanken die XNA vom IgG Isotyp der Lewis Tiere auf 58,4% (51,3 bis 65%) und nach Abstoßung waren nur noch 34,4% (23,3 bis 46,8%) detektierbar (jeweils statistisch signifikante Reduktion im Vergleich zum Ausgangswert, ANOVA Test on Ranks, Dunn's Methode $p < 0,05$). Auch die IgG XNA der PVG/C6- Ratten der Gruppen K bzw. L waren 6 Tage nach Behandlungsbeginn (Tag -15) auf 76,4% (von 67,9 bis 85,4%8) bzw. 74% (von 72 bis 95,4%) reduziert. Die IgG XNA der mit 10 mg/kg Leflunomid behandelten PVG/C6- Tiere (Gruppe K) lagen 24 Stunden nach Leberzellgabe bei 47,4% (47,2 bis 52,6%). Einen ähnlichen

Wert von 50,3% (49,7 bis 55,3%) zeigten die PVG/C6- Tiere, die mit 20 mg/kg B-Zellsuppressivum behandelt wurden. Vor der Herztransplantation (Tag -1) hatten die PVG/C6-Ratten der Gruppe K einen Mittelwert von 52,6% (45,3 bis 67,3%) und die der Gruppe L 55,1% (von 50,6 bis 63%) an IgG XNA im Serum. Nach Abstoßung waren die anti-MS Antikörper vom IgG Isotyp bei den PVG/C6- Tieren der Gruppe K bzw. L auf 25,3% (21 bis 33,2%) bzw. auf 22,2% (16,5 bis 40,4%) reduziert.

3.6 Untersuchung der zirkulierenden B-Zellen mittels Durchflußzytometrie

Der Anteil von B-Zellen (CD45+) und insbesondere von CD5+ positive B-Zellen (CD45+ CD5+) innerhalb der Lymphozyten wurde bei Lewis (Gruppe O) und PVG/C6- Ratten (Gruppe P) durchflußzytometrisch analysiert. Die Tiere hatten analog zu den Tieren der Gruppen H und L eine Kombination aus Splenektomie, B- und T-Zellsuppression, Depletion der NK-Zellen durch anti-asialo GM1 sowie eine Infusion mit Meerschweinchen Leberzellen erhalten (vgl. Tab. 3).

Vor Behandlungsbeginn (Tag -21) wiesen die Tiere beider Rattenstämme etwa 15% CD45 positive B-Zellen am Gesamt-Lymphozytenpool auf ($15,2\% \pm 2,1$ bei Lewis und $15,1\% \pm 2,2$ bei PVG/C6-; Abb. 27). Durch Splenektomie und tägliche Gabe des B-Zellsuppressivums Leflunomid kam es 6 Tage nach Behandlungsbeginn (Tag -15) zu einem Anstieg der CD45+ B-Zellen auf $18,6\% \pm 2,4$ in Lewis und signifikant auf $27,2\% \pm 0,8$ in PVG/C6- Ratten (ANOVA Test, Tukey Test, $p < 0,05$). Danach wurde die T-Zellsuppression gestartet, die transiente Depletion der NK-Zellen und die Infusion mit MS Leberzellen durchgeführt (Tag -14 und -13). Am Tag -11 waren bei den Lewis Ratten $12,7\% (\pm 5,4)$ CD45+ B-Zellen zu finden und damit 26% weniger als vor Behandlungsbeginn. Zum gleichen Zeitpunkt wiesen die PVG/C6- Ratten $25,6\% (\pm 2,7)$ CD45+ B-Zellen auf, immer noch 70% mehr als vor Start der Behandlung (statistisch signifikant, ANOVA Test, Tukey Test $p < 0,05$). Während bei den Lewis Ratten am Tag -3 in etwa der Ausgangswert erzielt wurde ($15,2\% \pm 4,1$), lagen die B-Zellen der PVG/C6- Ratten mit $20\% (\pm 10,2)$ immer noch 30% darüber. An den Tagen 4 bzw. 10 waren die B-Zellen bei den Lewis Ratten auf etwa die Hälfte des Ausgangswerts, nämlich $6,4\% (\pm 1,9)$ bzw. $8\% (\pm 2,2)$ signifikant reduziert (ANOVA Test, Tukey Test $p < 0,05$). Die PVG/C6- Ratten hingegen wiesen nur am Tag 4 etwa 20% weniger B-Zellen als bei Behandlungsstart auf ($12,3\% \pm 1,5$) und erreichten am Tag 10 mit $15,8\% (\pm 3,6)$ praktisch wieder ihren Ausgangswert.

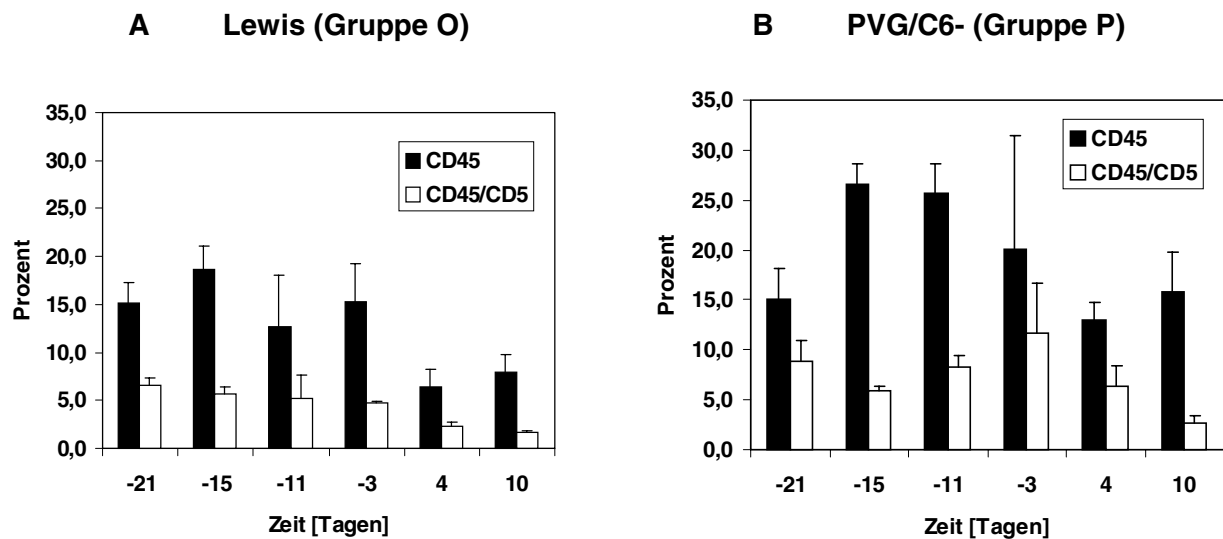


Abb. 27. Durchflußzytometrische Analyse der B-Zellen (CD45) und der CD5+ B-Zellen (CD5/CD45) in je 5 Lewis (A) und PVG/C6- Ratten (B) der Gruppen O und P.

Die Tiere wurden am Tag -21 splenektomiert und erhielten täglich 10 mg/kg Leflunomid zur B-Zellsuppression. Am Tag -15 startete die T-Zellsuppression und einen Tag später (Tag -14) erhielten die Ratten eine intraportale Infusion mit MS Leberzellen. Danach (Tag -13) wurde eine transiente NK-Zell-Depletion durchgeführt. Gezeigt sind die im ANOVA bzw. ANOVA on Ranks ermittelten Mittelwerte \pm Standardabweichung der CD45+ Zellen bzw. die Mediane \pm Bereich (von.. bis..) der CD45+CD5+ Zellen. Für die statistische paarweise Auswertung wurden der Tukey Test (CD45+Zellen) oder der Dunn's Methode (CD45+CD5+ Zellen) verwendet.

Hinsichtlich der CD5+ positiven B-Zellen (CD5+CD45+) gab es zwischen den beiden Rattenstämmen signifikante Unterschiede vor Behandlungsbeginn (Student's t-Test $p < 0,05$). Während bei den Lewis Ratten im Mittel 6,5% (6,0 bis 7,5%) doppelt positive B-Zellen zu detektieren waren, wiesen die PVG/C6- Ratten 8,9% (8,7 bis 10,7%) auf. Sechs Tage nach Behandlungsbeginn mit Splenektomie und B-Zellsuppression (Tag -15) sanken die CD5+ B-Zellen bei den Lewis Ratten um 14% von 6,5% auf 5,6% (5,5 bis 6,4%) und bei den PVG/C6- Ratten um 34% auf 5,9% (5,2 bis 6,3%). Am Tag -11 betrug der Anteil der CD5+CD45+ Zellen der Lewis Ratten 5,2% (3,6 bis 13,7%). Bei den PVG/C6- waren im Mittel 8,3% (7,2 bis 9,4%) doppelt positiven B-Zellen festzustellen und erreichten damit in etwa ihren Ausgangswert vor Behandlungsbeginn. Die CD+ positiven B-Zellen der Lewis Ratten nahmen dann kontinuierlich ab, d.h. auf 4,7% (4,5 bis 4,9%) am Tag -3, auf 2,3% (2,2 bis 2,8%) am Tag 4 und auf 1,6% (1,3 bis 1,9%) am Tag 10. Die CD5+CD45+ Zellen der Lewis Tiere wurden also während der Behandlung um etwa 76% signifikant im Vergleich zum Ausgangswert reduziert (ANOVA on

Ranks, Dunn' Methode $p < 0,05$). Nach einer Zunahme der doppelt positiven B-Zellen der PVG/C6- Ratten am Tag -3 auf 11,7% (6,3 bis 18%) kam es auch dort zu einer stetigen Reduktion bis zum Tag 4 auf 6,3% (5,4 bis 8,4%) und bis zum Tag 10 auf 2,7% (2,4 bis 3,5%). Bei dieser Gruppe wurde wie bei den Lewis Tieren der Gruppe O im Laufe der Behandlung eine signifikante Reduktion von etwa 70% erzielt (ANOVA on Ranks, Dunn's Methode $p < 0,05$).

3.7 Analyse zirkulierender Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen)

Ratten NK-Zellen aus peripherem Blut wurden sowohl durchflußzytometrisch unter Verwendung des mAk 3.2.3 als auch im Chromfreisetzungstest hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegenüber einer Mausmyelomzelllinie (YAC1) sowie mit Concanavalin A stimulierten Lymphozyten aus Milz von Maus und/oder MS analysiert.

3.7.1 Durchflußzytometrische Bestimmung von Ratten NK-Zellen

Nach Anfärbung der Ratten NK-Zellen mit dem aufgereinigten monoklonalen Maus-Antikörper (mAb) 3.2.3 und einem FITC-markierten anti-Maus-Sekundärantikörper wurde ihr prozentuale Anteil innerhalb der Lymphozyten in der Durchflußzytometrie (FACS-Messung) bestimmt. Hierfür war es zunächst erforderlich, die Fluoreszenzfärbung der Zellen zu etablieren.

3.7.1.1. Bedingungen der Fluoreszenzfärbung zur durchflußzytometrischen Bestimmung von NK-Zellen

Um NK-Zellen in einer Probe zu detektieren, wurde der aufgereinigte mAk 3.2.3 in einer 1:1000 Verdünnung (1,9 ng/ml) und der mit Rattenserum blockierte Sekundärantikörper 1:100 eingesetzt. Wurden die Antikörper in einer niedrigeren oder höheren Verdünnung verwendet, war der Unterschied zwischen ungefärbten und mit Fluoreszenz-markierten Zellen in der Durchflußzytometrie nicht optimal.

Da es sich bei dem mAk 3.2.3 um einen Mausantikörper vom IgG 1 Isotyp handelt, wurde als Isotypkontrolle der mAk 1224 in gleicher Konzentration eingesetzt. Die unspezifische Bindung der Isotypkontrolle zeigte bei 4 getesteten PVG/C6- Ratten einen Mittelwert von 0,36% (von 0,19 bis 0,6 %) fluoreszierende Ereignisse, wohingegen im Mittel 0,15% (von 0,1 bis 0,2 %) der Ereignisse FITC markiert waren, wenn die Zellen nur mit Puffer anstelle von mAk 3.2.3 inkubiert wurden. Wurden unbehandelte Lewis Ratten (n=3) verwendet, ergab die Isotypkontrolle im Mittel 0,16% (von 0,1 bis 0,2 %) und der mit Puffer erzielte Leerwert 0,03% (von 0 bis 0,05 %) Fluoreszenz-markierte Lymphozyten. Als Leerwert wurde daher immer der von der Isotypkontrolle erreichte Wert von der Probe abgezogen.

3.7.1.2. NK-Zellen in unbehandelten Ratten

Aus je 4 unbehandelten Lewis und PVG/C6- Ratten wurde unter CO₂ Betäubung das gesamte ACD-Blut gewonnen und die in 100 µl ACD-Blut enthaltenen Leukozyten mit dem Maus anti-Ratten NK-Zellen Antikörper (mAk 3.2.3) und mit anti-Maus-FITC gefärbt. Anschließend wurde im Durchflußzytometer der Anteil der NK-Zellen innerhalb der Lymphozyten bestimmt.

Pro ml ACD-Blut wurden bei den Lewis Ratten im Mittel $5,3 \times 10^6$ ($\pm 4,5 \times 10^5$) und bei den PVG/C6- Ratten bei $4,5 \times 10^6$ ($\pm 5 \times 10^5$) Leukozyten gewonnen. Während die Lymphozyten der PVG/C6- Tiere einen Anteil von 11,8% ($\pm 1,5$) NK-Zellen aufwiesen, waren bei den Lewis Ratten nur etwa die Hälfte ($4,6\% \pm 0,6$) an NK-Zellen zu finden.

Im Hinblick auf die Verwendung der Seren in einem Chromfreisetzungstest wurde versucht, mittels Absorption der B-Zellen an Nylonwatte oder durch Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) den Anteil der NK-Zellen zu erhöhen. Nach der Zellabsorption über Nylonwatte kam es zu einer Reduktion der Gesamtzellzahl, die im Mittel bei den Lewis Ratten 60% und bei den PVG/C6- Ratten 40 % betrug. Durch die Absorption an Nylonwatte konnte der Anteil der NK-Zellen bei PVG/C6- Ratten um etwa 25% auf 14,7% ($\pm 1,7$) erhöht werden. Bei den Lewis Tieren hingegen führte diese Methode zu einer Reduktion um etwa 24% auf 3,5% NK-Zellen ($\pm 0,4$). Während die Isolation der PBMCs mittels Percoll die NK-Zellen zweier unbehandelter Lewis Tiere von 5,3% bzw. 5,2% auf 11% bzw. 9,9% in etwa verdoppelte, wurde der NK-Zell-Anteil bei 7 unbehandelten PVG/C6- Ratten von durchschnittlich 8,8% ($\pm 1,5$) um etwa 51% auf 13,3 % ($\pm 2,9$) erhöht.

Wurden geringere Mengen ACD-Blut (0,5 bis 1 ml) von den mit Ether betäubten Tieren gewonnen und die in 100 µl enthaltenen Leukozyten für die NK-Zellbestimmung in der Durchflußzytometrie eingesetzt, enthielten die Proben von 24 unbehandelten PVG/C6- Ratten bzw. 8 unbehandelten Lewis Ratten im Mittel 6,1% ($\pm 1,2$) bzw. 2,6 % ($\pm 1,4$) NK-Zellen.

3.7.1.3. NK-Zellen in Ratten nach transients Depletion

Der Einfluss von Splenektomie, B- und T-Zellsuppression, Infusion mit MS Leberzellen und Gabe des anti-asialo GM1 Serums zur transienten NK-Zell-Depletion auf die im peripheren Blut vorhandenen NK-Zellen wurde bei Lewis und PVG/C6- Ratten der Versuchsgruppen O und P in der Durchflußzytometrie untersucht, die analog zu den Tieren der Gruppen H und L behandelt worden waren.

Vor Beginn der Behandlung konnten bei den Lewis bzw. PVG/C6- Ratten ein Mittelwert von 2,1% (1,9 bis 2,5%) bzw. 5,1% ($\pm 0,94$) NK-Zellen detektiert werden (Abb. 28). Sechs Tage nach Splenektomie und Start der B-Zellsuppression (Tag -15) waren die NK-Zellen bei den Lewis Ratten um mehr als die Hälfte auf 0,8% (0,35 bis 1,5%) und bei den PVG/C6- Ratten

sogar signifikant um etwa 77% auf 1,2% ($\pm 0,29$) reduziert (ANOVA Tukey Test $p < 0,001$). Am Tag -11 (2 Tage nach Gabe des anti-asialo GM1 Serums) kam es zu einer signifikanten Abnahme der NK-Zellen um etwa 95 bis 100% des Ausgangswertes bei Lewis Tieren auf 0% (von 0 bis 0,13%, ANOVA on Ranks, Dunn's Methode $p < 0,05$) und bei PVG/C6- Tieren auf $0,25\% \pm 0,13$ (ANOVA Tukey Test $p < 0,05$). Beim nächsten Abnahmezeitpunkt (Tag -3, 10 Tage nach Gabe des anti-NK-Zell-Serums) waren die NK-Zellen der Lewis Ratten noch um etwa 93% ($0,15\%$, $0,12$ bis $0,12\%$) und die der PVG/C6- Ratten um noch 86% ($0,71\% \pm 0,46$) reduziert. Im Laufe der Zeit stiegen die NK Zellen an. Bei den Lewis Ratten waren 17 bzw. 23 Tage (Tag 4 bzw. 10) nach Gabe des anti-asialo Serums $0,86\%$ ($0,64$ bis $0,86\%$) bzw. $0,65\%$ ($0,38$ bis $0,9\%$) und damit etwa 30% des Ausgangswertes zu detektieren. Die Lymphozyten der PVG/C6- Ratten wiesen zu den gleichen Zeitpunkten einen langsameren Anstieg des NK- Zell-Anteils auf etwa 20% des Wertes vor Behandlungsbeginn ($0,9\% \pm 0,32$ bzw. $1,11\% \pm 0,85$) auf. Damit erreichten der NK-Zell-Anteil bei beiden Rattenstämmen in etwa die Werte nach Splenektomie. Der Ausgangswert wurde während des getesteten Zeitraumes von keinem Individuum der beiden Rattenstämme erreicht.

3.7.2 Chrom-Freisetzungstest zur Bestimmung der Zytotoxizität von Ratten NK-Zellen

3.7.2.1. Stimulation der Lymphozyten aus Milzzellen mit Concanavalin A (Con A)

Zur Ermittlung der zur Stimulation der Lymphozytenproliferation geeigneten Concanavalin A (Con A)- bzw. FCS-Konzentrationen im Medium sowie der Inkubationsdauer wurden je $2,5 \times 10^5$ frisch präparierte Milzzellen eines C2BB/R- MS in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte in $150 \mu\text{l}$ Medium mit 10, 5 oder 2,5 % FCS und 16, 8, 4, 2, 1 und $0,5 \text{ mg/ml}$ Con A für die Dauer von 48 oder 72 Stunden kultiviert und die Proliferation durch Einbau von radioaktivem ^3H - Thymidin bestimmt. Die lichtmikroskopische Betrachtung der Zellen während der Kultivierung zeigte mit zunehmender Con A Konzentration zum einen eine stärkere Agglomeration der Zellen zum anderen eine vermehrte Entwicklung von Lymphoblasten, also Zellen mit deutlich gesteigerter Größe. Die Auswertung des Einbaus an radioaktiv markiertem Thymidin ergab bei einer 72-stündigen Stimulation eine höhere Aufnahme des Thymidins als nach Stimulation für die Dauer von 48 Stunden (Abb. 29). Die höchste Proliferationsrate wurde nach 72-stündiger Inkubation der Milzzellen mit $8 \mu\text{g/ml}$ Con A in Medium, das mit 5% FCS ergänzt war, erzielt.

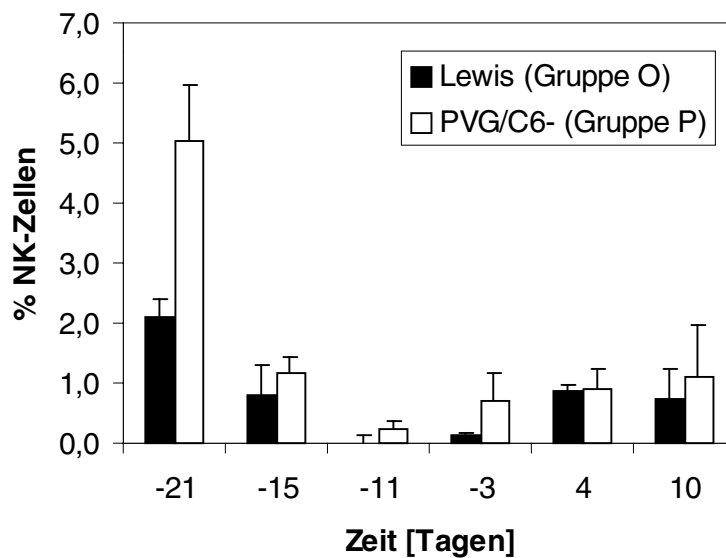


Abb. 28. NK-Zellanteil von je 5 Lewis (Gruppe O) und PVG/C6-Ratten (Gruppe P) nach transientser NK-Zell-Depletion.

Die Tiere wurden am Tag -21 splenektomiert und erhielten täglich 10 mg/kg Leflunomid zur B-Zellsuppression. Am Tag -15 startete die T-Zellsuppression durch tägliche Gabe von 10 mg/kg Ciclosporin. Einen Tag später (Tag -14) wurde jedem Tier 1×10^7 MS Leberzellen intraportal infundiert. Am Tag -13 wurden durch Gabe des anti-asialo GM1 Serums die NK-Zellen depletiert. Die NK-Zellen in 100 μ l ACD-Blut jedes Individuums wurden durchflußzytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die im ANOVA on Ranks ermittelten Mediane \pm Bereich (von.. bis..) der prozentualen Anteile der NK-Zellen bei den Lewis Ratten bzw. die im ANOVA ermittelten Mittelwerte \pm Standardabweichung bei den PVG/C6- Ratten. Zur statistischen paarweisen Auswertung wurde die Dunn's Methode bzw. der Tukey Test eingesetzt.

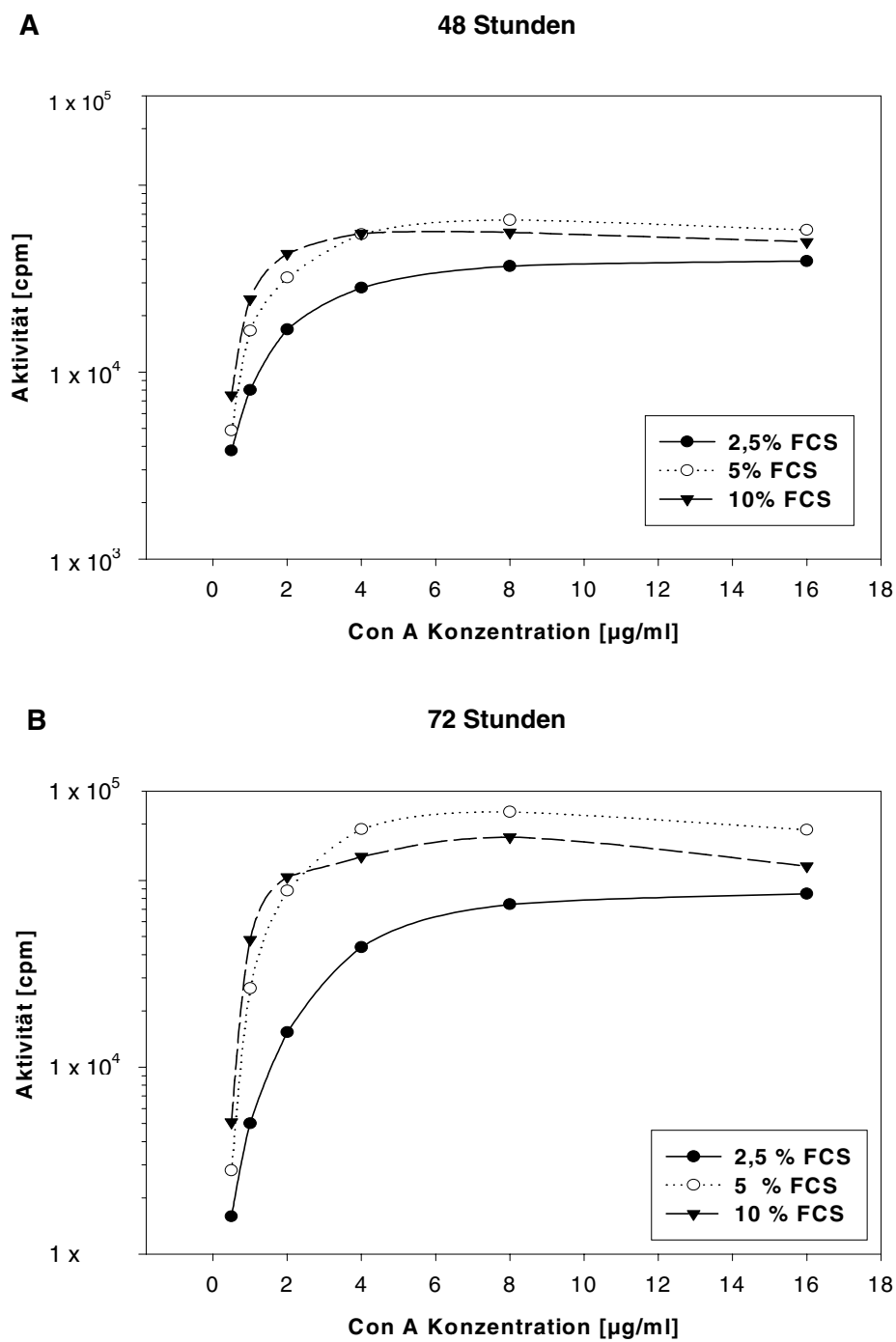


Abb. 29. Überprüfung der Lymphozytenproliferation im Mikrotitermaßstab.

Einbau von radioaktiv markierten Thymidin nach 48-(A) oder 72-stündiger (B) Stimulation der Lymphozytenproliferation von je $2,5 \times 10^5$ MS Milzzellen in einem Endvolumen von $150 \mu\text{l}$ in Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen FCS- und Con A- Konzentrationen im Medium.

Wurden die im Mikrotitermaßstab ermittelten Bedingungen auf größere Zellmengen (2×10^6 Zellen) übertragen, die dann in entsprechend mehr Medium in kleinen Zellkulturflaschen stehend kultiviert wurden, war bereits mikroskopisch der Anteil der gebildeten Lymphoblasten verringert. Überprüft wurde die Verwendung von 4, 8 und 16 $\mu\text{g/ml}$ Con A in Medium ergänzt mit 5 oder 10% FCS. Der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in je 150 μl der Zellsuspension war deutlich geringer als bei Kultivierung im Mikrotitermaßstab (Abb. 30). Die beste Stimulation der Lymphozytenproliferation bei größerer Milzzellanzahl wurde durch Einsatz von 4 $\mu\text{g/ml}$ Con A in Kombination mit 5% FCS im Medium erzielt.

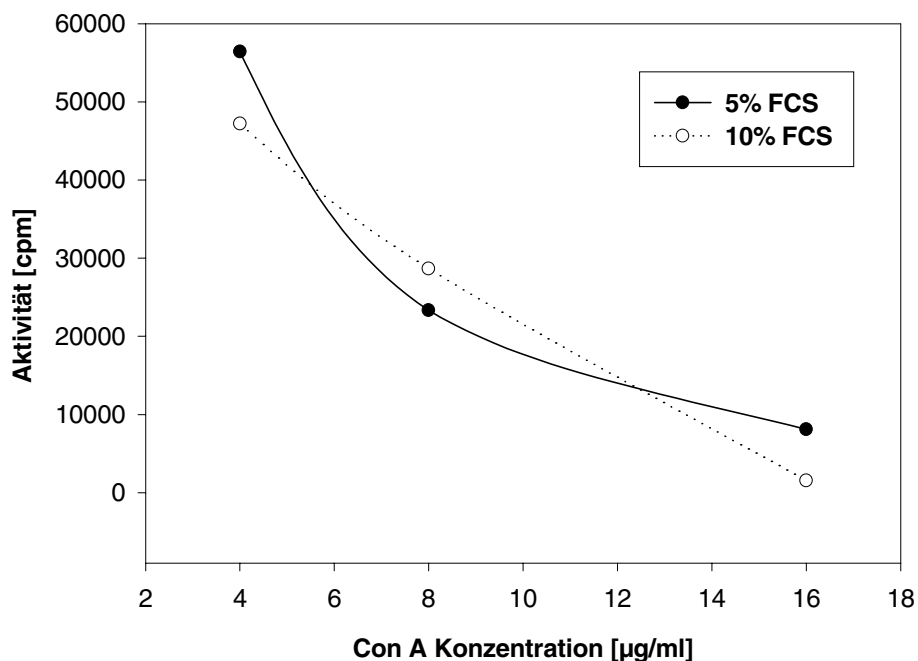


Abb. 30. Überprüfung der Lymphozytenproliferation in Zellkulturflaschen.

Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in 150 μl Zellsuspension aus je 2×10^6 MS Milzzellen, die zur Stimulation der Lymphozytenproliferation in 12 ml Endvolumen Medium supplementiert mit 5 oder 10 % FCS und unterschiedlichen Con A Konzentrationen in kleinen Zellkulturflaschen für 72 Stunden inkubiert wurden.

Zur Überprüfung der Eignung von MS oder Maus Lymphoblasten als Zielzellen für Ratten NK-Zellen wurden jeweils 2×10^6 Milzzellen oder Lymphknotenzellen in kleinen Zellkulturflaschen mit 1, 2 oder 4 $\mu\text{g/ml}$ Con A in einem Endvolumen von 5 oder 10 ml Medium, ergänzt mit 5% FCS, stehend 72 Stunden lang inkubiert und als Zielzellen in einem Chromfreisetzungstest gegen Leukozyten aus unbehandelten PVG/C6-Ratten in einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis (E:Z Verhältnis) von 50:1 eingesetzt. Die stärkste Lyse zeigte sich bei Verwendung von MS bzw. Maus Milzzellen, die mit 2 bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$ Con A in einem Endvolumen von 5 ml stimuliert waren (Abb. 31). Für alle weiteren Chromfreisetzungstests wurden je 2×10^6 MS oder Maus Milzzellen nach 72-stündiger Inkubation in einem Endvolumen von 5 ml Medium ergänzt mit 5% FCS und 2 oder 1 $\mu\text{g/ml}$ Con A durchgeführt.

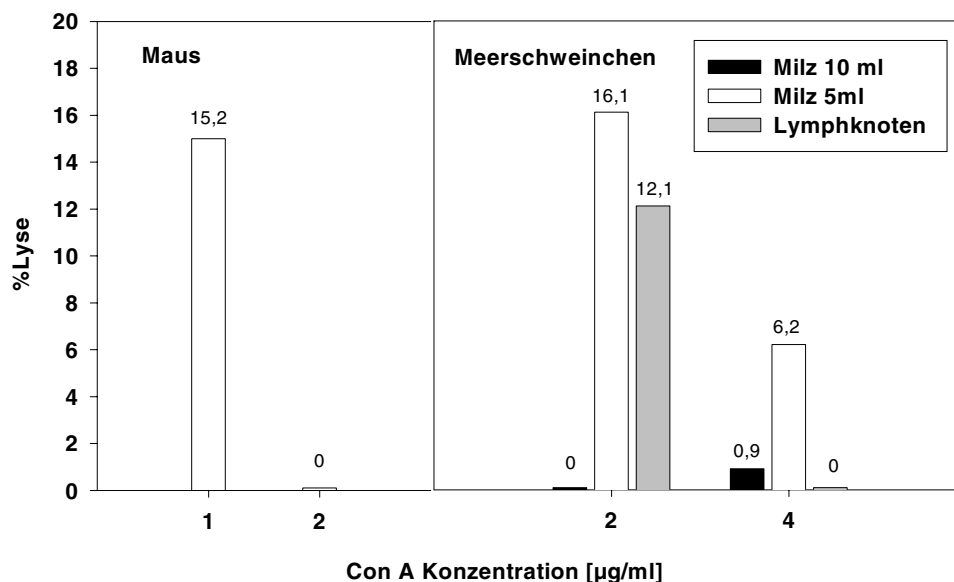


Abb. 31. Lyse von Con A stimulierten Lymphoblasten aus Maus Milz oder MS Milz und Lymphknoten durch Ratten NK-Zellen.

Je 2×10^6 Maus oder MS Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden mit 1, 2 oder 4 $\mu\text{g/ml}$ Con A in einem Endvolumen von 5 oder 10 ml für die Dauer von 72 Stunden stimuliert und nach Markierung mit radioaktivem Chrom als Zielzellen gegen Ratten NK-Zellen in einem Zytotoxizitätstest eingesetzt.

3.7.2.2. NK-Zell-Zytotoxizität nach transienter Depletion

Von PVG/C6- Ratten (Gruppe P), die analog zu den Tieren der Gruppe L mit einer Kombination aus Splenektomie, B- und T-Zellsuppression, MS Leberzellinfusion und Gabe des anti-asialo GM1 Serums zur transienten Depletion der NK-Zellen behandelt wurden, wurde die NK-Zell-Zytotoxizität bei 2 Ratten am Tag +14 und bei den 4 übrigen Tieren am Tag +21 in einem Chromfreisetzungstest analysiert. Dazu wurden die PMBCs der Tiere aus dem gesamten ACD-Blut isoliert und als Effektorzellen in einem Zytotoxizitätstest gegen ^{51}Cr markierte Zielzellen, YAC-1, MS und Maus Lymphoblasten eingesetzt. Parallel wurden die NK-Zellen der eingesetzten Effektorzellen durchflußzytometrisch bestimmt.

Die für den Chromfreisetzungstest eingesetzten PMBCs besaßen 6,0% bis 16,7% NK-Zellen. Wie in Abb. 32 gezeigt, lysierten die Effektorzellen im Mittel $33,2\% \pm 8,5$ der YAC-1 Zellen. Die Con A stimulierten MS Milzzellen zeigten eine Lyse von $4,6\% \pm 1,9$. Im Vergleich zu den MS Lymphoblasten war die Lyse gegenüber Con A stimulierten Maus Zellen mit $9,9\% \pm 2,0$ signifikant höher (Student's t-Test $p= 0,027$).

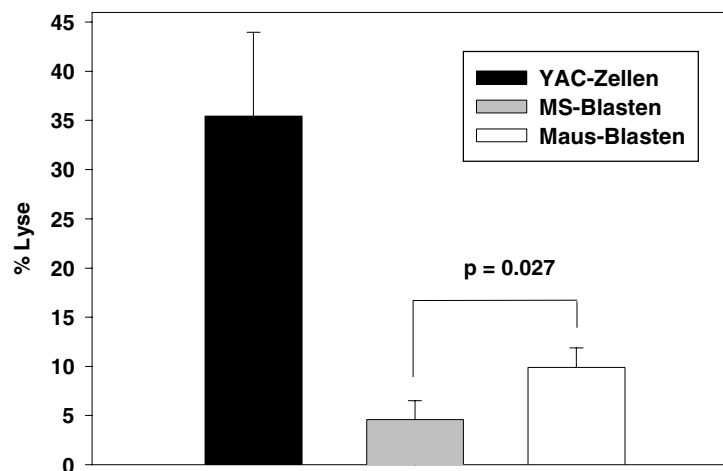


Abb. 32. Prozentuale Lyse der YAC1-, MS und Maus Blasten durch PMBCs der PVG/C6- Ratten aus Gruppe P).

Die PVG/C6- Ratten der Gruppe P ($n=6$) wurden analog zu den Tieren der Gruppe L mit einer Kombination aus B- und T-Zellsuppression, transienter NK-Zell-Depletion und Gabe von Donor.-Antigen behandelt. Die PMBCs wurden am Tag 14 ($n=2$) oder am Tag 21 ($n=4$) gegen mit radioaktivem Chrom markierte YAC1-Zellen sowie mit Con A stimulierte Milzzellen aus Maus und MS in einem Zytotoxizitätstest bei einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 25:1 eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der prozentualen Lyse der verschiedenen Zielzellen.

3.8 Nachweis von MS oder Ratten C3 mittels RT-PCR

Zum Nachweis von Ratten oder MS C3 wurde eine RT-PCR entwickelt. Der Test sollte zur Analyse der Absiedlung oder Zirkulation von MS Leberzellen nach intraportaler Infusion in Ratten eingesetzt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass das infundierte Zellgemisch aus Kupfer'schen Sternzellen, B- und T-Zellen, Hepatozyten und dendritischen Zellen besteht. Davon sind zumindest die Kupfer'schen Sternzellen, die Hepatozyten und die dendritischen Zellen in der Lage, das Komplementprotein C3 zu synthetisieren.

Für diese RT-PCR wurden speziesspezifische Primer (MH64 bis MH70, vgl. Anhang) entwickelt, die jeweils im Bereich der α -Ketten der für C3 kodierenden DNA hybridisierten. Insgesamt zeigten die Bereiche der α -Ketten von C3 der 2 Spezies große Homologien. Es wurden folgende Primer konstruiert: MH64 und MH65, die als sense Primer im Bereich der Basenpaare 4367 bis 4386 bzw. 4475 bis 4494 von Ratten C3 konzipiert waren; MH66 als reverser Primer für Ratten C3, der im Bereich der Basenpaare 4781 bis 4798 hybridisierte, 2 reverse Primer für MS C3 (MH68 und MH69), die homolog zu den Basenpaaren 4374 bis 4394 bzw. 4554 bis 4572 waren und schließlich noch 2 MS C3 reverse Primer (MH69 und MH70), die im Bereich der Basenpaare 4986 bis 5005 bzw. 4781 bis 4800 hybridisierten. Beim Einsatz der verschiedenen Primerkombinationen in einer PCR mit DNA der entsprechenden Spezies wären also folgende DNA-Fragmente zu erwarten gewesen: aus Ratten C3 mit der Primerkombination MH64/MH66 ein etwa 431 bp langes Fragment und mit den Primern MH65/MH66 ein etwa 323 bp langes Stück. Aus MS C3 wurde rechnerisch mit der Primerkombination MH67/MH69 bzw. MH67/MH70 ein 631 bp bzw. ein 426 bp langes Fragment und mit MH68 kombiniert mit MH69 oder MH70 ein 451 bp oder ein 246 bp langes DNA-Stück amplifiziert.

Um die Eignung der Primer und vor allem ihre Speziesspezifität zu überprüfen, wurde aus der Leber von MS und Ratte Gesamt-RNA isoliert, durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und diese dann für die PCR mit den konstruierten Primern eingesetzt.

Die Präparation der Gesamt-RNA aus Leber war nur dann qualitativ gut, wenn die Leberzellsuspension vor der eigentlichen RNA-Isolation etwa 3 Stunden bei 4°C in RPMI 1640 Medium inkubiert wurde. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel konnten die dominierenden Banden der ribosomalen RNA bei etwa 5 kb (28S) und bei etwa 2 kb (5S) beobachtet werden (Abb. 33, Spuren 3 bis 5). Bei sofortiger Verwendung der Leberzellen hingegen war die isolierte RNA sehr stark degradiert (Abb. 32, Spuren 1 und 2). Die Ausbeute an Gesamt-RNA konnte mit der verwendeten Methode nicht mit der eingesetzten Zellmenge korreliert werden. Je 5 μ g der Gesamt-RNA wurde für die Synthese von 12 μ l cDNA mittels reverser Transkription eingesetzt. Für die Überprüfung der Primer wurden je 1 μ l der cDNA aus MS oder Rattenleber mit den verschiedenen Primern in der PCR verwendet, also auch MS cDNA mit Primern für Ratten C3 und umgekehrt.

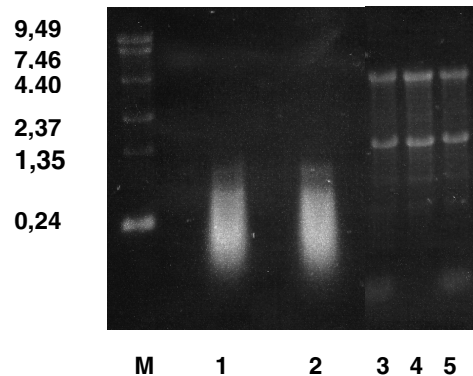


Abb. 33. Aus Rattenleber isolierte Gesamt-RNA im Agarosegel.

Die sofortige Aufbereitung der Leberzellsuspension zur Isolation der RNA führte zu einer starken Degradation der RNA (Spuren 1 und 2). Nach 3-stündiger Inkubation der Suspension bei 4°C hingegen wurde eine bessere Qualität der RNA erzielt (Spuren 3 bis 5). M: Marker, RNA-ladder.

Mit den für MS C3 konzipierten Primern MH67/MH69 wurde wie erwartet aus MS cDNA ein etwa 631 bp langes DNA-Fragment amplifiziert, wohingegen aus Ratten cDNA oder destilliertem Wasser (Negativkontrolle) kein Amplifikat gewonnen wurde (Abb. 34). Die Kombination der Primer MH67/ MH 70 ergab aus MS cDNA ein etwa 420 bp großes Amplifikat allerdings auch bei Verwendung von Ratten cDNA als Template wurden DNA-Banden (über 700 und 900 bp) in der PCR amplifiziert. Auch die eigentlich für MS C3 konstruierten Primerkombinationen MH 68/MH69 und MH 68/MH70 ergaben mit den cDNAs beider Spezies DNA-Fragmente. Der Einsatz der für Ratten C3 konzipierten Primer MH/64/MH66 und MH65/MH66 amplifizierte aus Ratten cDNA die erwarteten DNA-Fragmente von 431 bp und 323 bp, jedoch keine DNA aus MS cDNA.

In allen weiteren Versuchen wurden die MS-spezifischen Primer MH67/MH69 (Ergebnis: 631 bp Fragment) und die Ratten-spezifische Primerkombination MH64/MH66 (431 bp) eingesetzt.

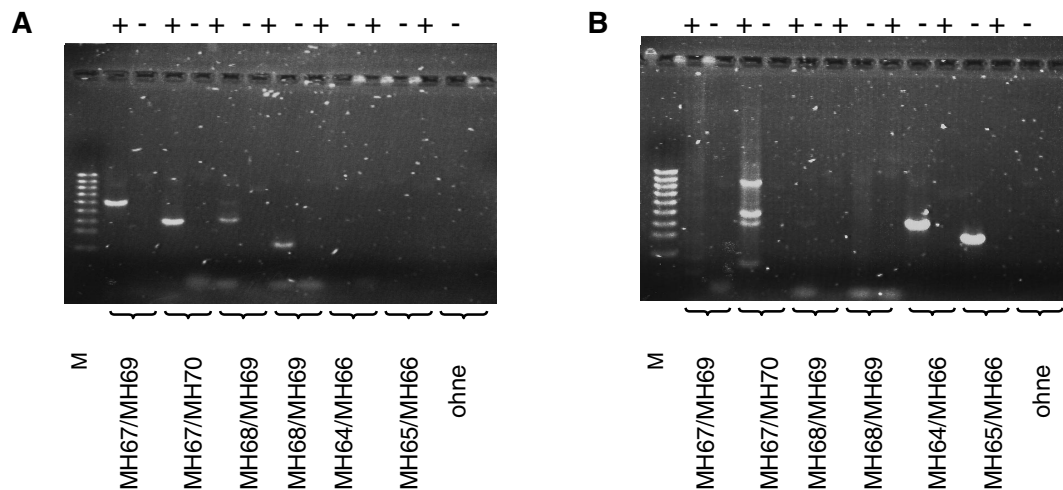


Abb. 34. PCR mit unterschiedlichen Primern aus MS (A) und Ratten cDNA (B).

Durch Reverse Transkription aus Ratten und MS Gesamt-RNA wurde cDNA gewonnen. Je 1 μ l dieser cDNA (+) bzw. als Negativkontrolle destilliertes Wasser (-) wurden für die PCR mit den unterschiedlichen Primerkombinationen eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde auf einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht betrachtet. M: Marker: 100 bp ladder.

Durch Verwendung verschiedener cDNA-Konzentrationen für die PCR wurde die Sensibilität des Nachweises von C3 ermittelt (Abb. 35). Die untere Nachweisgrenze betrug bei MS etwa 40 pg Gesamt-RNA und bei Ratten etwa 4 pg Gesamt-RNA.

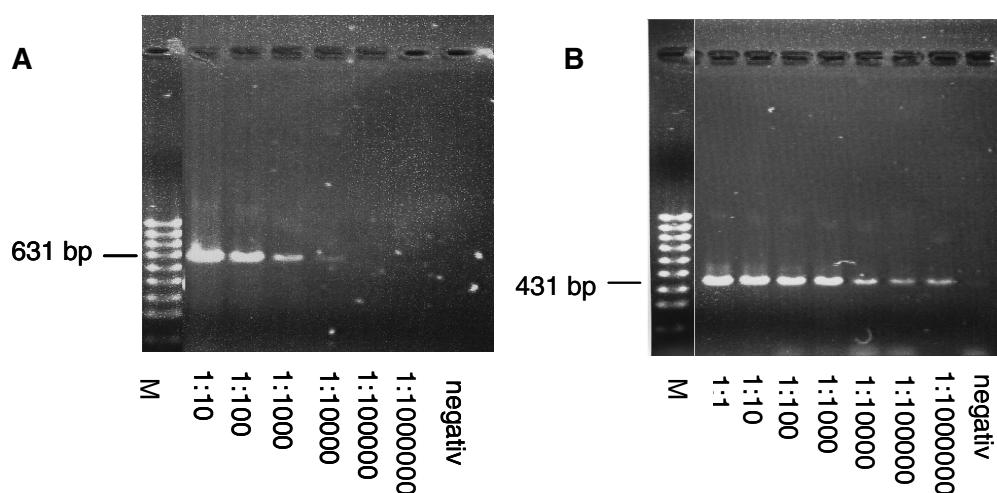


Abb. 35. Bestimmung der Nachweisgrenze der RT-PCR auf MS (A) oder Ratten (B) C3.

Je 1 μ l unterschiedliche Verdünnungen der cDNA wurden für die PCR auf MS C3 mit den Primern MH67/MH69 (A) oder auf Ratten C3 mit den Primern MH64/MH66 eingesetzt. Je 10 μ l PCR-Produkt wurden auf einem 1,2% Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt. M: Marker 100 bp ladder.

Nach Infusion mit 10^7 MS Leberzellen in dekomplementierte Lewis Ratten wurde je 2 Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten (3 Stunden, 1, 3 oder 7 Tage) die Leber entnommen und mittels RT-PCR das Vorhandensein von MS Leberzellen überprüft. Zu keinem Zeitpunkt konnte C3 vom MS in der Leber des Empfängers nachgewiesen werden, wohingegen die Kontrolle auf Ratte C3 immer positiv verlief.

Da sich die Präparation von RNA aus Leber bei Tieren, die weiter im Versuch bleiben sollten, als unpraktikabel erwies, wurden in weiteren Versuchen die RNA aus Blutkuchen nach Serumgewinnung präpariert und für die RT-PCR auf C3 eingesetzt. Hierbei zeigte sich meist eine gute RNA-Qualität. Dabei stieg die Nachweisgrenze von Ratten C3 in unbehandelten Ratten auf 1 ng Gesamt-RNA an. Außerdem wurden die Qualität und Quantität der isolierten RNA durch die Gabe des B-Zellsuppressivums Leflunomid negativ beeinflusst. Bereits 7 Tage nach Behandlung von splenektomierten Lewis Ratten stieg die Nachweisgrenze von Ratten C3 auf etwa 400 ng Gesamt-RNA an. Wurden in diese Tiere MS Leberzellen infundiert, konnte aus dem Blutkuchen zu den Zeitpunkten 3 Stunden und 1 Tag nach Leberzellinfusion kein MS C3 nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Die Xenotransplantation, also die Übertragung von Organen zwischen verschiedenen Spezies, könnte eine Möglichkeit darstellen, das Problem der Diskrepanz zwischen Bedarf und Verfügbarkeit menschlicher Organe zu lösen. Dem steht die Überwindung immunologischer und physiologischer Inkompatibilitäten gegenüber. Aus ethischen, tier- und artenschutzrechtlichen Gründen wird derzeit die Transplantation von Schwein auf Mensch favorisiert. Zur Untersuchung der immunologischen Mechanismen der Transplantatabstoßung kann das Meerschweinchen (MS)/Ratte Modell eingesetzt werden. In beiden Spezieskombinationen führen präformierte xenoreaktive Antikörper (XNA: **X**enoreaktive **N**atural **A**ntibodies) und die Aktivierung des Komplementsystems zu hyperakuten Abstoßung (HAR: **H**yper**A**cute **R**ejection) eines vaskularisierten Organs innerhalb weniger Minuten. Durch Inhibition des Komplementsystems und/oder Depletion der XNA kann die HAR überwunden werden. In der Folge unterliegt das Organ einer verzögerten Abstoßungsreaktion (DXR: **D**elayed **X**enograft **R**ejection).

In dieser Arbeit sollen die humoralen und zellulären Abstoßungsmechanismen im diskordanten Tiermodell MS/Ratte analysiert und Methoden zu ihrer Überwindung entwickelt werden. Zum einen wurde die orthotope Lebertransplantation von MS auf Ratte sowie Möglichkeiten zur Analyse der Stoffwechsellistung dieses Organs nach „Langzeitüberleben“ etabliert. Zum anderen wurden in diesem Tiermodell die immunologischen Mechanismen der Abstoßung nach heterotoper Herztransplantation sowie deren Überwindung durch verschiedene immunsuppressive Behandlungsschemata untersucht.

4.1 Orthotope Lebertransplantation von MS auf Ratte (OLT_X)

Ein künstlicher Organersatz für die Leber steht bisher nur im sehr begrenzten Umfang zur Verfügung. Es besteht lediglich die Möglichkeit, extrakorporale Perfusionssysteme unter Verwendung von ganzen Lebern (Neuhaus und Blumenhardt, 1993) oder von Leberzellkulturen einzusetzen (Rozga *et al.*, 1994; Bader *et al.*, 1995; Gerlach *et al.*, 1996). Somit stellen fast alle Formen der irreversiblen Leberinsuffizienz mit drohendem Organversagen potentielle Indikationen zur Lebertransplantation dar. Im Vergleich zu anderen Organen, wie Herz Lunge und Niere, ist bei der allogenen Lebertransplantation eine besondere Resistenz gegen humorale Abstoßungsmechanismen beobachtet worden (Starzl *et al.*, 1974). Aus immunologischer Sicht scheint die Leber damit besonders für die Transplantation, d.h. auch für die Xenotransplantation geeignet zu sein. Auf der anderen Seite stellt sich gerade bei Xenotransplantation der Leber, des zentralen Stoffwechselorgans, die Frage nach physiologischer Kompatibilität.

4.1.1 Etablierung der Technik der OLTX von MS auf Ratte

Im konkordanten Hamster/Ratte Modell wurde die erfolgreiche Übertragung einer Leber bereits beschrieben (Celli *et al.*, 1995; Sankary *et al.*, 1998). Durch die Kombination von B- und T-Zellsuppression mittels Leflunomid und FK506 (Tacrolimus) war das Transplantat mehr als 30 Tage funktionsfähig. Im diskordanten System MS/Ratte hingegen gestaltete sich die orthotope Lebertransplantation (OLTX) wesentlich schwieriger. Hier wurden bisher Überlebenszeiten von nur wenigen Stunden beobachtet (Crafa *et al.*, 1993) verbunden mit einer schlechten Reperfusion des Organs (Settaf *et al.*, 1989; Schraa *et al.*, 1996). Die Depletion des Komplementsystems durch Cobra Venom Faktor (CVF) und der Einsatz des nicht aterialisierten Lebertransplantationsmodell nach Kamada *et al.* (1981) führte zu keiner nennenswerten Verlängerung des Transplantatüberlebens im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Schraa *et al.*, 1996). Dies legt die Vermutung der Beteiligung von nicht immunologisch bedingten Vorgängen bei der frühen Transplantatabstoßung nahe. In erster Linie stellen anatomische Speziesunterschiede eine große Hürde dar (Delriviere *et al.*, 1998). So besitzt die Portalvene des MS ein dickes Muskelgewebe, das in der Ratte nicht vorhanden ist, und den 1,5-fachen größeren Durchmesser des Gefäßes bedingt. Als Folge davon ist der portale Blutfluss im MS etwa viermal höher als in der Ratte. Weitere Unterschiede sind die verschiedenen Längen des Dünndarms und des Dickdarms (im MS zwei- bzw. viermal so lang wie in Ratte). Der Vergleich der Anatomie und Studien der Hämodynamik zeigte, dass es nach Xenotransplantation zu Spasmen der Portalvene (Delriviere *et al.*, 1998) und folglich zu einer verminderten Durchblutung des Organs kommt (Tanaka *et al.*, 1999). All diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Übertragung einer Leber von MS auf Ratte kein geeignetes Modell zur Untersuchung der Abstoßungsmechanismen nach Xenotransplantation darstellt.

Im Laufe dieser Arbeit wurde eine Technik etabliert, die eine erfolgreiche Durchführung einer Lebertransplantation von MS auf Ratte möglich erscheinen lässt. Die Anpassung der Operationstechnik an die anatomischen Unterschiede zwischen den beiden Spezies, d.h. Entnahme der Spenderleber mit verlängerter *V. cava*, Split-Leber-Transplantation und Einsatz einer auf Raumtemperatur erwärmten Perfusionslösung, ergab ein Überleben von 3 Stunden (Gruppe A). Die Gabe von CVF zur Dekomplementierung brachte keine signifikante Verlängerung (Gruppe B). Die Transplantate beider Gruppen zeigten eine inhomogene Perfusion mit Blut des Empfängers und etwa 60 bis 80% apoptotische Hepatozytenkerne. Die Gluconeogenese der Empfänger war deutlich gestört.

Zur Überwindung der schlechten Reperfusion der Leber wurde der Vasodilator Epoprostenol in dekomplementierten Tieren eingesetzt (Gruppe C). Epoprostenol gehört zu den Prostacyclin Analoga, die zu den vielversprechendsten Substanzen zur Begrenzung von Ischämie-/Reperfusionsschäden nach Lebertransplantation zählen (Klein *et al.*, 1999). Die Transplantate wurden unter Verwendung von Epoprostenol schnell und homogen reperfundiert, die Tiere wa-

ren normoglykämisch und nur etwa 10% der Hepatozytenkerne zeigten apoptotische Veränderungen. Die Verbesserung der Reperfusion durch Einsatz eines Vasodilators (Nitroprussid) war zuvor von Miki *et al.* (1999) beschrieben worden. Ein Nachteil von Nitroprussid ist allerdings, dass sich toxisches Cyanid anreichern kann, wenn die Substanz mit einer höheren Rate als 2 µg/kg pro Minute infundiert wird. Der Einsatz von Epoprostenol als Vasodilator zeigte neben einem gefäßerweiternden Effekt auch eine Inhibition der Aggregation von Blutplättchen und insbesondere eine verbesserte Mikrozirkulation der Leber (Anthuber *et al.*, 1996).

Durch Einsatz des Vasodilators Epoprostenol in Kombination mit Dekomplementierung des Empfängers durch CVF konnten die Überlebenszeiten der Transplantate im MS/Ratte Modell auf mindestens 17 Stunden erhöht werden. Es wurden damit Zeiten erreicht, die in der gleichen Größenordnung wie bei der heterotopen Herztransplantation nach Gabe von CVF lagen (vgl. Tab. 8). Dieses pharmakologische Regime ist somit ein wichtiger Schritt zur Untersuchung der funktionellen und immunologischen Kompatibilität einer diskordant transplantierten Leber.

4.1.2 Immunologische und molekulare Kompatibilität nach Leberxenotransplantation

Gerade bei der Lebertransplantation in der diskordanten Situation stellt sich die Frage nach der Kompatibilität bzw. Immunogenität der von der Xenoleber gebildeten Stoffwechselprodukte. Bereits in der konkordanten Situation hat sich gezeigt, dass die transplantierte Leber versucht, das aus dem Spenderorganismus gewohnte Milieu aufrecht zu erhalten. So wurde beispielsweise nach Xenotransplantation einer Pavianleber festgestellt, dass die von Leber synthetisierten Albumin-, Harnsäure- und Cholesterolspiegel auf einem deutlich niedrigeren, für den Spender physiologischen Niveau lagen als auf dem für den Menschen physiologischen Wert (Starzl *et al.*, 1993; Fung *et al.*, 1997). Im konkordanten Modell Hamster/Ratte wurde nach Langzeitüberleben der transplantierten Leber eine Erhöhung des Serum-Lipid-Spiegels festgestellt (Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie), wobei die Lipoproteine in der xenotransplantierten Ratte dieselbe Zusammensetzung wie im Spender aufwiesen (Mollevis *et al.*, 1999; Tandin *et al.*, 2000).

Neben anderen Stoffwechselprodukten synthetisiert die Leber etwa 95% aller Komplementfaktoren, so dass nach Transplantation dieses Organs zwischen 2 unterschiedlichen Spezies ein Hybrid-Komplementsystem entstehen würde. Im konkordanten System Hamster/Ratte, bei der durch Immunsuppression ein Langzeitüberleben nach Lebertransplantation beobachtet wurde, kam es innerhalb von 72 Stunden zu einer Konversion des Komplementsystems vom Empfänger zum Spender (Celli *et al.*, 1997). So sollte auch bei Lebertransplantation im MS/Ratte Modell nach etwa 2 bis 3 Tagen ein Hybrid-Komplementsystem entstehen. Um diese Komplement-

konversion und in der Folge auch die Auswirkungen der Aktivierung dieses Systems auf das Transplantat und den Empfängerorganismus zu untersuchen, bieten Antikörper gegen MS Komplementproteine ein wichtiges Instrumentarium. In der Arbeitsgruppe standen gegen MS C5 und C5a gerichtete Antikörper in Form von single chain Fvs (scFvs) zur Verfügung, die im Laufe dieser Arbeit näher charakterisiert und hinsichtlich ihrer Eignung für diagnostische und therapeutische Zwecke im MS/Ratte Modell überprüft wurden. Insbesondere die Eignung der MS C5-spezifischen scFvs zur Inhibition des Komplementsystems, zur C5-Konzentrationsbestimmung im Serum sowie zur Detektion von C5-Ablagerungen im Gewebe wurden analysiert.

ScFvs bestehen aus den variablen Domänen der leichten (V_L) und der schweren Immunglobulin-kette (V_H), die die Antigenbindungsstelle umfassen und zur Stabilisierung über eine Peptidsequenz miteinander verknüpft sind (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). Durch Amplifikation der Gene der V_L und V_H Ketten sowie Einführung von Restriktionsstellen in die verwendeten Primer kann die DNA direkt in Vektoren für die Expression in Bakterien kloniert werden (Ward *et al.*, 1989; Winter und Milstein, 1991). Nach Expression der scFvs auf der Oberfläche von filamentösen Phagen (Phage-Display) können Phagen mit Bindung an das entsprechende Antigen samt der genetischen Information für das scFv Fragment durch Panning gegen das gewünschte Antigen selektiert werden (Köhl, 1999). Mit dieser Methode waren die gegen MS C5 und MS C5a gerichteten scFvs isoliert worden (Güleryüz, 1999).

4.1.2.1 Aufreinigung und Charakterisierung der Antikörper gegen MS Komplementprotein C5

Die für MS C5-spezifischen löslichen scFvs (B3, E10, H10 und F11) wurden zunächst entweder durch eine Kombination aus Metallchelate-Chromatographie und Gelfiltration oder durch Affinitätschromatographie an Protein L aufgereinigt. Die Aufreinigung über Metallchelate-Chromatographie reichte nicht aus, völlig reine MS C5-spezifische scFvs zu erhalten. Die Elutionsfraktionen wiesen Verunreinigungen mit *E. coli* Proteinen auf. Weder eine Vorelution der gebundenen Proteine durch Puffer mit niedrigeren Imidazol-Konzentrationen noch die Verwendung von Zn^{2+} oder Cu^{2+} als Metallionen (Casey *et al.*, 1995) führten zu einer höheren Reinheit der eluierten scFvs. Daher wurde im Anschluss an die Metallchelate-Chromatographie eine Gelfiltration durchgeführt. Die Gelfiltration ermöglicht die Unterscheidung von Monomeren, nicht kovalenten Dimeren und aggregierten Antikörperfragmenten, die häufig nach Expression von scFvs entstehen (Kipriyanov *et al.*, 1995; Kretzschmar *et al.*, 1996). Eine Alternative zur Gelfiltration ist die Chromatographie über einen Anionenaustauscher, die von Plückthun (1991) ebenfalls in Kombination mit der Metallchelate-Chromatographie erfolgreich für die Aufreinigung von scFvs verwendet wurde.

Ein Nachteil der Aufreinigungsmethode mit Metallchelate-Chromatographie in Kombination mit Gelfiltration ist die Notwendigkeit der Durchführung von 2 verschiedenen Schritten, wohingegen die Affinitätschromatographie an Protein L eine effiziente Aufreinigung von scFvs in einem einzigen Schritt ermöglicht. Protein L stammt aus der Zellwand des Bakterium *Peptostreptococcus magnus* und bindet an die Struktur-gebenden Framework-Regionen der leichten Ketten von Immunglobulinen, ohne mit der Antigen-Bindungsstelle zu interferieren (Åkerström und Björck, 1989). Daher eignet sich Protein L im Gegensatz zu Protein G aus Streptokokken der Gruppe G oder Protein A aus *Staphylococcus aureus*, die mit dem konstanten Fc-Teil von Immunglobulinen interferieren, auch zur Aufreinigung von scFvs. Im Falle von humanen Antikörpern bindet Protein L an leichte Ketten der Subgruppen κ I, κ III und κ IV sowie teilweise λ II und λ III (Nilson *et al.*, 1992; Åkerström *et al.*, 1994). Über die Bindungseigenschaften von murinen scFvs war bisher nichts bekannt. Die Ergebnisse der Aufreinigung von anti-MS C5 scFvs zeigen, dass murine leichte Ketten der κ I Subgruppe nicht jedoch der κ V Subgruppe an Protein L binden.

Mit einer der beiden Aufreinigungsmethoden, also Metallchelate-Chromatographie kombiniert mit Gelfiltration oder Protein L Affinitätschromatographie, wurden 1 bis 3 mg reine scFvs aus 11-Kulturen gewonnen, die dann auf ihre möglichen Verwendungsmöglichkeiten getestet wurden.

Um die molekularen Interaktionen zwischen scFvs und Antigen detaillierter zu charakterisieren, wurden die Affinitäten der aufgereinigten scFvs gemessen. Die Affinität eines Antikörpers wurde durch seine Assoziation an das Antigen und seine Dissoziation vom Antigen bestimmt. Zur Bestimmung der Affinitäten wurde die biomolekulare Interaktionen Analyse (BIA) eingesetzt, basierend auf der schnellen und zuverlässigen Technik der „Surface Plasmon Resonance“ (SPR) (Malmqvist, 1993). Das optische Phänomen der SPR wird durch Interaktionen an der Oberfläche eines Sensorchips verursacht, wobei polarisiertes Licht an der Chipoberfläche in einem bestimmten Winkel reflektiert und dabei in seiner Intensität erheblich reduziert wird. Die Reduktion der Intensität ist abhängig von Massenveränderungen an der Chipoberfläche und wird als Signal in Response Units durch die BIAcore Technologie gemessen (s. www.biocore.com). Die aufgereinigten anti-MS C5 scFvs wurden an den Sensorchip gekoppelt, um Aviditätseffekte zu vermeiden, die durch Di- oder Multimerisation von scFvs verursacht werden können. Außerdem wurde eine hohe Flussrate (30 μ l/min) und eine niedrige Oberflächenbindungskapazität (< 400 RU) gewählt, so dass keine Limitierung durch Massentransport die Assoziationskonstanten beeinflusste. Unter diesen Bedingungen wurden Bindungsaffinitäten (K_D) von $1,48 \times 10^{-8}$ bis $1,12 \times 10^{-7}$ M gemessen. ScFvs mit guten Bindungsaffinitäten (10^{-8} bis 10^{-9}) wurden aus Banken isoliert, die durch Immunisierung entstanden waren, z.B. ein anti-Hapten scFv mit einer K_D von 1×10^{-8} M (Clackson *et al.*, 1991). Eine Antigenreduktion während der Antikörper-Selektion führt zur Anreicherung von Klonen mit hoher Affinität (Barrett *et al.*, 1992). Obwohl beide Strategien, d.h. Immunisierung und eine 15- bis 100fache Reduktion des Antigens während der Selektion, eingesetzt wurden (Güleryüz, 1998), zeigte nur der Klon E10 eine Bindungsaffinität im unteren

nanomolaren Bereich. Um scFvs mit höherer Affinität zu erhalten, sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben, z.B. Klonierung in einen Bakterienstamm mit hoher Mutationsrate (Irving *et al.*, 1996), Amplifikation der scFv-Gene mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit hoher Fehlerrate (error prone PCR; Hawkins *et al.*, 1992), das erneute Mischen der Antikörperketten (chain shuffling ; Clackson *et al.*, 1991; Stemmer, 1994; Cramer *et al.*, 1996) und die Zufalls-Mutagenese von Aminosäuren innerhalb der Bereiche der Antigen-Erkennung (Complementarity Determining Regions; CDRs) der leichten und schweren Kette (CDR walking ; Yang *et al.*, 1995).

4.1.2.2 Inhibition des Komplementsystems durch MS C5-spezifische Antikörper

Die Blockierung von Komplementkomponenten mit monoklonalen Antikörper gegen humanes (Rollins *et al.*, 1995) und gegen Ratten C5 (Vakeva *et al.*, 1998) wurde bereits beschrieben. Die Fähigkeit der selektierten MS C5-spezifischen scFvs zur Inhibition der klassischen Komplementkaskade wurde *in vitro* in einem hämolytischen Test überprüft. Zwei der scFvs blockierten effektiv die Hämolyse in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis, wobei der Klon H10 etwa 10mal potenter war als der Klon E10. Der inhibitorische Effekt auf das Komplementsystem *in vivo* nach Injektion in MS wurde noch nicht getestet. Dies lag an der begrenzten Menge der zur Verfügung stehenden aufgereinigten scFvs. Um eine Inhibition des Komplementsystems *in vivo* zu erzielen, injizierten Vakeva *et al.* (1998) 20 mg aufgereinigten Antikörper pro kg Körpergewicht. Um vergleichbare Mengen anti-MS C5 scFvs in einem sinnvollen Kollektiv von mindestens 5 Tieren einzusetzen, hätte die Anzahl oder der Maßstab der Aufreinigungen erheblich vergrößert werden müssen.

4.1.2.3 C5-Konzentrationsbestimmung im Serum

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der MS C5-spezifischen scFvs ist die Konzentrationsbestimmung von MS C5 im Serum. Konzentrationsbestimmungen mit der „Surface Plasmon Resonance“ Technik (SPR) im BIAcore können mit nur einem Antikörper durchgeführt werden, der zudem nicht markiert werden muss. Kein Sekundärreagenz wird benötigt und die Messungen sind viel schneller als Konzentrationsbestimmungen im ELISA. Mit der SPR-Technologie unter Verwendung des aufgereinigten anti-MS C5 scFv E10 konnte eine Serumkonzentration von 240 µg C5/ ml beim MS bestimmt werden. Verglichen mit den 80 µg/ml C5 im humanem Serum (Bitter-Suermann und Köhl, 1997) ist diese Konzentration 3mal höher. Die untere Nachweisgrenze des Assays liegt bei 100 ng/ml, also etwa 0,04% der normalen MS C5-Konzentration. Dieser Test, eventuell auch in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper gegen Ratten C5 (Vake-

va *et al.*, 1998), ermöglicht daher die Untersuchung der Entstehung eines Hybrid-Komplementsystems nach xenogener Lebertransplantation von MS auf Ratte.

Um die Komplementaktivierung detaillierter als im hämolytischen Test zu analysieren, wäre eine Kombination der C5- und C5a-Konzentrationsbestimmung ein wichtiger Schritt. Der Einsatz der zur Verfügung stehenden anti-MS C5a scFvs zur Konzentrationsbestimmung, insbesondere die erforderliche Aufreinigung, wurde bisher noch nicht überprüft.

4.1.2.4 Detektion von C5-Ablagerungen im Gewebe

Wenn es nach der Komplementkonversion vom Empfänger- zum Donortyp nach Lebertransplantation zu einer Aktivierung Des Komplementsystems, z. B. Durch eine bakterielle Infektion, kommt, kann es zu Ablagerungen von C5 als Teil des Membran-Angriff-Komplexes (MAC) im Gewebe kommen. Da die Komplementregulatoren eine gewisse Speziespezifität aufweisen, ist eine verminderte Degradation der Komplementproteine vom Donortyp im Empfänger denkbar. In dieser Arbeit wurde daher die mögliche Anwendung der anti-MS C5 scFvs in der Immunhistologie überprüft. Zwei der 4 scFvs waren in der Lage, C5-Ablagerungen im Gewebe nach heterotoper Herztransplantation von Ratte auf MS zu detektieren. Diese scFvs erkennen wahrscheinlich MS C5 innerhalb des MAC, der nach C5-Spaltung im Gewebe lokalisiert ist. Es ist bekannt, dass Antikörper aus rekombinatorischen Antikörperbanken als immunochemische Reagenzien eingesetzt werden könne (Neri *et al.*, 1998). Beispielsweise werden scFvs nach Konjugation mit radioaktivem Jod zur gezielten Markierung von Tumoren benutzt und zeigen dabei eine bessere Diffusion durch das maligne Gewebe als intakte Immunglobuline (Begent *et al.*, 1996; Huston *et al.*, 1996; Colcher *et al.*, 1998).

Die bisher gewonnenen Daten legen nahe, dass die MS C5-spezifischen Antikörper sowohl für einen therapeutischen Ansatz (Inhibition des MS Komplementsystems) als auch für den diagnostischen Einsatz (Konzentrationsbestimmung von C5, Detektion von MS C5- Ablagerungen im Gewebe) eignen. Die Antikörper bieten somit ein wichtiges Instrumentarium zur Überprüfung der Stoffwechsellleistung und der Kompatibilität der von der Leber synthetisierten Komplementproteine.

4.2 Heterotope Herztransplantation (HHTX) von MS auf Ratte

Da die OLTX in der diskordanten Spezieskombination MS/Ratte chirurgisch sehr aufwendig ist und daher nur geringe Versuchsansätze gemacht werden können, wurde für die Analyse der humoralen und zellulären Mechanismen der Abstoßung in diesem Modell und zur Entwicklung von Behandlungsschemata zu deren Überwindung die chirurgisch weniger aufwendige heterotope Herztransplantation (HHTX) eingesetzt. Nach HHTX in unbehandelte Lewis Ratten (Gruppe C) kam es zu einer hyperakuten Abstoßung des Transplantates innerhalb von 13 Minuten. Immunhistochemisch wies das Organ starke Ablagerungen von C3 und IgM-Antikörpern auf. Um diese Abstoßungsreaktion zu verhindern und das Transplantatüberleben zu verlängern, wurde das Komplementsystem durch Applikation von Cobra Venom Faktor (CVF) oder durch Einsatz komplementdefizienter Empfänger inhibiert und zum anderen die präformierten xenoreaktiven Antikörper der Ratte reduziert.

4.2.1 Inhibition des Komplementsystems zur Überwindung der HAR

Bei der HAR nach Xenotransplantation zwischen diskordanten Spezies spielt die Aktivierung des Komplementsystems eine entscheidende Rolle. In dem von uns ausgewählten Tiermodell MS/Ratte wird die Aktivierung des Komplementsystems zum einen durch den klassischen Weg nach Bindung xenoreaktiver natürlicher Antikörper (XNA) an das fremde Epithel zum anderen aber, und dies spielt die Hauptrolle, über den alternativen Weg hervorgerufen (Miyagawa *et al.*, 1988; Pruitt *et al.*, 1991; Leventhal *et al.*, 1993a).

4.2.1.1 Komplementinhibition durch Cobra Venom Faktor (CVF)

Um die HAR zu überwinden, kann das Komplementsystem, z.B. durch Cobra Venom Faktor (CVF) inhibiert werden, was zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens führt (Leventhal *et al.*, 1993b; Tavakoli *et al.*, 1993; Candinas *et al.*, 1996d). CVF führt zum massiven Abbau von C3 und daher zu einer Depletion der nachgeschalteten Komplementkaskade (Vogel *et al.*, 1984).

Die Applikation des kruden Lyophilisates von CVF führt zum Tod von Lewis Ratten. Diese unerwünschte Wirkung kann auf Verunreinigungen wie Phospholipase A₂ (Lachmann *et al.*, 1976) oder ein etwa 13 kD schweres Protein mit lymphozytotoxischer Aktivität (Ballow *et al.*, 1973) zurückgeführt werden. Phospholipase A₂ wurde bereits 1903 aufgrund der Fähigkeit, die Lyse von Erythrozyten zu induzieren, beschrieben (Kyes, 1903). Zur Entfernung von störenden Verunreinigungen wurde das Lyophilisat von käuflich erworbenen CVF nach der von Beukelman *et al.* (1987) beschriebenen Methode über einen Anionenaustauscher in einem 1-Schritt Verfahren aufgereinigt. Dadurch wurden unter anderem ein etwa 115 und ein 55 kD schweres Protein ent-

fernt. Die antikomplementäre Aktivität des aufgereinigten CVF wurde *in vitro* gegen normales humanes Serum und *in vivo* nach Applikation in Lewis Ratten im hämolytischen Test bestätigt. Die höchste und dauerhafteste (für mindestens 3 Tage) Inhibition des Komplementsystems *in vivo* wurde durch intravenöse Applikation von je 50 µg aufgereinigtem CVF pro Tier an 2 aufeinander folgenden Tagen erzielt, ohne dass unerwünschte Nebenwirkungen auftraten.

Die in der Literatur angegebenen CVF-Mengen zur Überwindung der HAR nach heterotoper Herztransplantation von MS auf Ratte variieren in großem Maße. Die einzelnen Dosen reichen von 20 IU/kg Körpergewicht (Hancock *et al.*, 1997) bis 200 IU/kg (Tavakoli *et al.*, 1993). Zur Verlängerung des Transplantatüberlebens nach xenogener Herztransplantation von MS auf Ratte wurde häufig eine repetetive CVF-Gabe gewählt (Tavakoli *et al.*, 1993; Scheringa *et al.*, 1995; Candinas *et al.*, 1996; Hancock *et al.*, 1997). Dadurch wurde ein maximales Transplantatüberleben von 88 Stunden erreicht (Leventhal *et al.*, 1993b).

Aufgrund der Ergebnisse der Inhibition des Komplementsystems *in vivo* wurden Lewis Ratten am Tag vor (Tag -1) und am Tag der heterotopen Herztransplantation mit je 50 µg aufgereinigtem CVF dekomplementiert (Tab. 2, Gruppe E). Diese Behandlung führte zu einem verlängerten Transplantatüberleben von 17,5 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Lewis Ratten (Tab. 2, Gruppe D), die das MS Herz bereits nach 10 bis 18 Minuten hyperakut abstießen. Während bei den unbehandelten Tieren eine massive Ablagerung von C3 im Transplantat beobachtet wurde, zeigten sich erwartungsgemäß in dekomplementierten Ratten keine C3-Ablagerungen.

4.2.1.2 Komplementinhibition durch Einsatz Komplement-defizienter Empfänger

Eine andere Möglichkeit zur Inhibition des Komplementsystems und damit verlängertem Transplantatüberleben nach HTX bietet der Einsatz einer Komplement-defizienter Empfängerspezies. So wird bei C6 defizienten Ratten (PVG/C6-) die Bildung des terminalen Membran-Angriff-Komplexes (MAC) inhibiert. Wurde ein MS Herz heterotop auf PVG/C6- Ratten transplantiert (Gruppe I) transplantiert, so kam es nach 14 (8 bis 24) Stunden zu einer Abstoßung. Die Verlängerung des Transplantatüberlebens in PVG/C6- Ratten im Vergleich zu unbehandelten Lewis Ratten (Gruppe D) beruht auf einer Inhibition der MAC-Bildung und nicht auf Unterschieden zwischen den beiden Rattenstämmen. Von Brauer *et al.* (1993) wurde gezeigt, dass komplementkompetente PVG Ratten ähnlich wie unbehandelte Lewis Ratten ein heterotop transplantiertes MS Herz nach etwa 26 Minuten hyperakut abstoßen. Die Behandlung von Lewis Ratten mit einem in PVG/C6- Ratten generierten Antikörpern gegen C6 und damit ebenfalls Inhibition der MAC-Bildung führt zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens auf 38 ± 11 Stunden (Brauer *et al.*, 1996).

Vergleicht man mit CVF dekomplementierte Lewis Tiere mit PVG/C6- Ratten, ist das Transplantatüberleben ähnlich. Im Gegensatz zu den CVF behandelten Lewis Ratten wies das abgestoßene Transplantat von PVG/C6- Ratten starke C3-Ablagerungen auf. In PVG/C6- Ratten ist zwar die Bildung des terminalen MAC inhibiert aber nach Transplantation findet eine Aktivierung u.a. von C3 und C5 statt. Dadurch werden zum einen Spaltprodukte von C3 auf dem Gewebe abgelagert, was die Adhesion von polymorphkernigen Zellen (PMN) an das Endothel des Xenotransplantats verstärkt und dadurch Gewebsschädigungen verursachen kann (Vercelotti *et al.*, 1991). Zum anderen entstehen auch die Anaphylatoxine C3a und C5a, die als potente proinflammatorische Mediatoren zur Vasodilation und verstärkten Gefäßpermeabilität führen (Brauer *et al.*, 1996). C5a ist zudem ein Chemotaxin für PMN. Daneben bilden sich C3b und iC3b auf der Oberfläche die als Liganden für CR1 und CR3 auf den PMN dienen. Alles in allem kommt es also trotz C6-Defizienz zu einer massiven Infiltration von PMN in das Organ. Dies wurde in Versuchen mit C6 Depletion in Lewis Ratten mit einem anti-Ratten C6 Serum, gewonnen in PVG/C6- Ratten, bestätigt (Brauer *et al.*, 1996). Eine erhöhte Überlebenszeit in PVG/C6 Ratten gegenüber Komplement-inhibierten Lewis Ratten wurde durch zusätzliche Applikation von Leumedin, einem anti-inflammatorischen Agens, erzielt, das die CD11/b/CD18 (mac-1) abhängige Neutrophilenadhäsion inhibiert (Davis *et al.*, 1995; Jakobs *et al.*, 1997; Jakobs *et al.*, 1998).

4.2.2 Xenoreaktive natürliche Antikörper (XNA)

Durch Inhibition des Komplementsystems bei den Ratten der Gruppen D und E kam es zu einer längeren Überlebenszeit der heterotop transplantierten MS-Herzens von etwa 17,5 bzw. 14 Stunden. Die abgestoßenen Organe wiesen unter anderem massive Ablagerungen von Ratten IgM-Antikörpern auf. Bei diesen Antikörpern handelt es sich um präformierte, xenoreaktive natürliche Antikörper (XNA), die gegen MS Gewebe gerichtet sind. Im Laufe dieser Arbeit wurde zunächst ein Test zur Detektion von XNA im Rattenserum etabliert, der dann im weiteren zur Analyse der XNA unter verschiedenen Behandlungsschemata mit B-Zellsuppression zur Reduktion dieser Antikörper eingesetzt wurde.

4.2.2.1 Nachweis von XNA

Um Ratten anti-MS Antikörper zu quantifizieren, wird häufig der von Leventhal *et al.* (1992b) entwickelte ELISA eingesetzt, bei dem Membranextrakte aus MS Thrombozyten als Antigen verwendet werden (Fryer *et al.*, 1995; Schraa *et al.*, 1996; Hancock *et al.*, 1997). Die Bestimmung der XNA-Spiegel kann aber auch mit einem ELISA gegen kultivierte primäre MS Endothelzellen erfolgen (Platt *et al.*, 1990a; Soares *et al.*, 1992). Beide Methoden sind für den Nachweis von Ratten anti-MS Antikörpern geeignet, wobei eine ähnliche lineare Titration der Seren

beobachtet wird (Scherrer *et al.*, 1994). Ein großer Nachteil dieser Assays ist die Notwendigkeit ein Tier zu töten, um genügend Antigenmaterial zu erhalten. Als eine alternative Methode wurden Membranextrakte der MS Fibroblasten-ähnlichen Zelllinie JH4 hinsichtlich der Xenoreaktivität mit Seren der zwei Rattenstämme analysiert, die von uns im MS/Ratte Xenotransplantationsmodell eingesetzt wurden, nämlich Lewis und PVG/C6 Ratten. Die JH4 Zelllinie wurde mit verschiedenen primären MS Zellen, wie Thrombozyten, Leber- und Milzzellen verglichen. Unabhängig vom verwendeten Antigen waren die ELISA Signale unbehandelter Ratten bei der Detektion von IgM Antikörpern etwa 5- bis 20mal höher als bei IgG Antikörpern. Dies entspricht den Ergebnissen von Leventhal *et al.* (1992b).

Die Xenoreaktivität der anti-MS Antikörper in unbehandelten Ratten variierte in Abhängigkeit des verwendeten Membranextraktes. So wurden im Schnitt höhere ELISA Signale bei Detektion von IgM Antikörpern in Lewis Rattenserum gegen Membranextrakte aus der JH4-Zelllinie, Leberzellen und Thrombozyten als gegen Antigene aus Milzzellen erzielt. Beim Einsatz von PVG/C6-Seren, wurde die höchste IgM Reaktivität gegen die JH4-Zelllinie beobachtet. Diese Ergebnisse sprechen für die Verwendung von Membranextrakten von der unbegrenzt verfügbaren JH4-Zelllinie als Antigen im ELISA zum Nachweis von Ratten anti-MS Antikörpern.

Die Untersuchung der 10 individuellen Seren von Lewis oder PVG/C6 Ratten im XNA-ELISA zeigte zudem eine große interindividuelle Reaktivität. Folglich sollte jede therapeutische Manipulation der B-Zell-Antwort und daraus resultierende Änderung der XNA-Spiegel im einzelnen Individuum überwacht werden. Auch für humane Gal α 1-3 Gal Antikörper, die eine wichtige Rolle bei der diskordanten Xenotransplantation von Schwein auf Mensch spielen, wurde eine interindividuelle Variabilität festgestellt (Buonomano *et al.*, 1999).

Im ELISA gegen Membranextrakte der JH4 Zelllinie, Thrombozyten und Milzzellen wurde eine signifikant höhere durchschnittliche IgM-Reaktivität von Seren der PVG/C6- Ratten im Vergleich zu Lewis Rattenserum festgestellt. Diese Beobachtung wurde auch von Brauer *et al.* (1993) gemacht, wobei allerdings eine durchflußzytometrische Bestimmung der an MS Lymphozyten bindenden Ratten IgM-Antikörpern durchgeführt wurde.

Die unterschiedlichen Signalstärken von individuellen Seren oder bei Verwendung der verschiedenen Zelltypen als Antigenquelle im ELISA legten folgende Vermutungen nahe: 1. Unterschiedliche Individuen besitzen XNA, die verschiedene Antigene erkennen oder 2. verschiedene Zelltypen exprimieren unterschiedliche Antigene, die von XNA erkannt werden. Deshalb wurden im Immunblot die Antigenmuster der verschiedenen Membranextrakte, die von individuellen Seren von unbehandelten Lewis oder PVG/C6- Ratten erkannt werden, untersucht. Sowohl IgG als auch IgM Antikörper erkannten gleiche Antigenmuster und auch die individuellen Seren der beiden Rattenstämme zeigten keine Unterschiede. Nur in Abhängigkeit vom eingesetzten Membranextrakt variierte das erkannte Antigenmuster. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen von Scherrer *et al.* (1994), die beim Vergleich von MS Thrombozyten

und kultivierten Endothelzellen unter Verwendung von Rattenserum im Immunblot ähnliche, von IgG oder IgM Antikörpern erkannte Antigenmuster feststellten, die in Abhängigkeit des verwendeten Zelltypes variierten. Um auszuschließen, dass die Ratten XNA gleiche Zuckerstrukturen auf unterschiedlichen Proteinen erkennen, wäre der Einsatz von Membranpräparationen nach gezielter Deglykosylierung im Immunoblot erforderlich.

4.2.2.2 Reduktion der XNA

Um eine hyperakute Abstoßung nach Xenotransplantation in der diskordanten Spezieskombination zu vermeiden, werden neben Inhibition des Komplementsystems auch die Depletion/Reduktion der XNA durchgeführt. Zur Reduktion der Ratten anti-MS Antikörper wurde das B-Zellsuppressivum Leflunomid oder dessen Derivat Malonitrylamid (MNA) eingesetzt. Leflunomid führt als *de-novo*-Pyrimidin-Synthese-Inhibitor zu einer Reduktion von xenoreaktiven Antikörpern (Siemasko *et al.*, 1996). Die alleinige Gabe von 10 oder 20 mg/kg Leflunomid pro kg Körpergewicht führte in PVG/C6-Ratten zu einer Reduktion der IgM XNA um maximal 50% innerhalb von 7 Tagen. Eine höhere Dosierung wurde nicht angewendet, da mit hohen Dosen auch die Toxizität von Leflunomid zunimmt, was sich in Anaemie, Durchfall und pathologischen Veränderungen in der Leber manifestiert (Chong *et al.*, 1999). Durch Kombination der medikamentösen B-Zellsuppression mit Splenektomie ließ sich die Reduktion der XNA steigern. So wurde bei täglicher Gabe von 10mg/kg MNA in splenektomierten Lewis Ratten IgM XNA nach 5 Tagen um 70% und nach 9 Tagen um etwa 74% signifikant reduziert (Tab. 3, S. 76, Gruppe N). Die Verwendung von Leflunomid an Stelle von MNA ließ die IgM XNA-Spiegel in Lewis Tieren nach 6 Tagen sogar um etwa 80% sinken (Tab. 2, S.74, Gruppe H). Die Kombination Splenektomie mit täglicher Gabe von Leflunomid (10 bzw. 20 mg/kg) senkte auch in PVG/C6-Ratten die XNA innerhalb von 6 Tagen signifikant um 80 bzw. 83%.

Eine deutliche Reduktion der XNA der Ratte wurde also nur durch Kombination der medikamentösen B-Zellsuppression in Kombination mit Splenektomie erzielt. Durch Entnahme der Milz, einem peripheren lymphatischen Organ, werden ausgereifte antigenspezifische aber auch noch ungeprägte Lymphozyten, die aus Knochenmark und Thymus einwandern, entfernt. Splenektomie alleine führt zu einer Abnahme aller vorhandenen IgM-Antikörper, darunter auch der xenoreaktive Anteil (Scheringa *et al.*, 1995b). Immerhin 0,1% der Lymphozyten in der Milz von LOU/C Ratten gehören zu den IgM sezernierenden Zellen, wohingegen in anderen lymphoiden Organen, wie mesenterialen Lymphknoten, Peyer'sche Plaques und Knochenmark, nur etwa 0,03 bis 0,04% IgM-sekretierende Zellen innerhalb der dort ansässigen Lymphozytenpopulation zu finden sind (Soares *et al.*, 1995). Es wurde bereits gezeigt, dass die Splenektomie zu einer Langzeit-Depletion einer erheblichen Menge der zirkulierenden Ratten XNA vom IgM-Isotyp führt (Soares *et al.*, 1993; Reding *et al.*, 1994).

Die Kombination Splenektomie und Gabe eines B-Zellsuppressivums (MNA oder Leflunomid) führte zu einer effektiven Reduktion der Ratten XNA, die auch nicht durch Gabe von MS Antigen unterbrochen wurde (Tab. 3, Gruppe N und Tab 2 Gruppen H, K und L). Dass die Gabe von MS Antigen in Form einer intraportalen Infusion mit MS Leberzellen einen enormen Anstieg nicht nur der IgM sondern auch der IgG XNA mit einem Maximum nach ca. 7 (IgM) bzw. 21 Tagen (IgG) verursachte, wurde in unbehandelten Lewis Ratten nachgewiesen (Tab. 3, Gruppe M).

4.2.2.3 Transplantatüberleben nach Reduktion der XNA

Wurde in Lewis Ratten, die zur Reduktion der XNA 10 Tage zuvor splenektomiert wurden und zusätzlich täglich 10 mg/kg des B-Zellsuppressivums MNA erhielten (Tab. 2, S. 74, Gruppe F), ein MS Herz heterotop transplantiert, so wurde das Organ bereits nach etwa 24 Minuten hyperakut abgestoßen. In der Histologie zeigte das Transplantat keine Ablagerungen von IgM aber dafür starke C3-Ablagerungen, ein Hinweis auf die wichtige Rolle des Komplementsystems. Die alleinige Reduktion der XNA im MS/Ratte Modell reicht nicht aus, um eine hyperakute Abstoßung zu verhindern. Daher postulierten bereits andere Arbeitsgruppen, dass die Aktivierung des Komplementsystems in dieser Spezies-Kombination hauptsächlich über den alternativen Weg erfolgt (Miyagawa *et al.* 1988; Leventhal *et al.*, 1993a). Während Miyagawa *et al.* (1988) zwar den Verbrauch der Komplementfaktoren C2 und C4 des alternativen Aktivierungsweges aber keine XNA nachweisen konnten, wurden von Leventhal *et al.* (1993b) der xenoreaktive Antikörperanteil durch Immunsuppression um das 64-fache reduziert. Auch in unseren Versuchsgruppen waren trotz Immunsuppression mit Leflunomid oder MNA noch etwa 10 bis 20% der vor Behandlungsbeginn bestimmten IgM-Antikörper zum Zeitpunkt der Transplantation vorhanden. Möglicherweise reichen diese wenigen xenoreaktiven Antikörper aus, das Komplementsystem auch über den klassischen Weg zu aktivieren.

Wurden hingegen die XNA in Lewis Ratten durch B-Zellsuppression reduziert und gleichzeitig das Komplementsystem durch Gabe von CVF inhibiert (Gruppe G), wurde das Transplantatüberleben auf 47 Stunden verlängert. In der Histologie wurde eine starke Infiltration mit Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) festgestellt, so dass diese verzögerte Abstoßung durch eine IgM- und Komplement-unabhängige Einwanderung und Aktivierung dieser Zellpopulationen in das Transplantat mit konsekutiver Zerstörung des Organs verursacht wird.

4.2.3 Induktion von B- und NK-Zell-Toleranz durch Einsatz verschiedener immunsuppressiver Regime

Um ein „Langzeitüberleben“ des Transplantates zu erreichen, scheint die Induktion von Toleranz gegen das Spenderorgan im Empfänger eine wesentliche Voraussetzung zu sein. Bei der Herztransplantation im konkordanten Tiermodell Hamster/Ratte wurde bereits ein „Langzeitüberleben“ der Transplantate beobachtet. Durch kurzfristige Blockade des Komplementsystems mittels CVF kombiniert mit einer kontinuierlichen Inhibition der T-Zellantwort mittels Ciclosporin A (CsA) waren die transplantierten Herzen über 3 bzw. 4 Monate funktionell aktiv (Bach *et al.*, 1997b; Lin *et al.*, 1998c). In der Arbeitsgruppe von M. Waer wurde die besondere Bedeutung T-Zell-unabhängiger Mechanismen bei der verzögerten Transplantatabstoßung (DXR, delayed xenograft rejection) gezeigt. Durch Behandlung von T-Zell-defizienten Nacktratten mit dem Immunsuppressivum Leflunomid kombiniert mit einer Infusion von Spender-Antigen in Form einer Herzzellsuspension und einer transienten NK-Zell-Depletion durch einmalige Gabe des anti-Asialo GM1 Antiserums wurde eine speziesspezifische B- und NK-Zell-Toleranz erzeugt (Lin *et al.*, 1998c). Die B-Zelltoleranz wird durch die Gabe von Leflunomid und Spenderantigen induziert und persistierte auch nach Absetzen der tolerogenen Regimes für mehr als 2 Monate (Xia *et al.*, 1999).

In Anlehnung an diese Ergebnisse sollte auch im diskordanten MS/Ratte Modell die Induktion einer B- und NK-Zell-Toleranz überprüft werden. Dazu wurden Lewis und PVG/C6- Ratten nach Splenektomie täglich mit dem B-Zellsuppressivum Leflunomid behandelt (Tab. 2, S. 74, Gruppen H, K und L). Am Tag –15 startete die T-Zellsuppression durch tägliche Gabe von CsA. Als Spender-Antigen wurde den Tieren einen Tag später (Tag –15) MS Leberzellen intraportal infundiert (vgl. 4.2.3.1), wobei die Lewis-Ratten zur Vermeidung der sofortigen Zerstörung der xenogenen Zellen dekomplementiert wurden. Danach (Tag –13) erhielten die Tiere zur transienten NK-Zell-Depletion das anti-Asialo GM1 Antiserum. Am Tag 0 wurde den Tieren heterotop ein MS Herz transplantiert.

Um den Einfluss von T-Zell vermittelter Abstoßung zu vermeiden wurden die Tiere durch CsA T-Zell-supprimiert. CsA ist ein Pilzmetabolit aus *Tolypocladium inflatum Gams* und bewirkt eine selektive Inhibition der T-Zellen, insbesondere der T-Helferzellen ohne eine Myelosuppression hervorzurufen (Borel *et al.*, 1976; Kay and Benzie, 1984; Shevach, 1985).

4.2.3.1 Infusion mit Donor-Antigen

In der Arbeitsgruppe von M. Waer wurde als Spender-Antigen eine Herzzellsuspension intravenös verabreicht (Lin *et al.*, 1998c). Die Vorversuche mit intravenöser Applikation einer MS Leberzellsuspension führten zum Tod der Ratten kurz nach Injektion aufgrund von Lungenembolie und Herzstillstand. Aus Allo- und Xenotransplantation ist bei Mäusen und Ratten eine erhöhte Überlebenszeit von vaskularisierten und nicht vaskularisierten Transplantaten nach Spender-spezifischer Immunisierung vor oder während der Transplantation bekannt (Gorczynski *et al.*, 1994; Gorczynski *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 1999). In vielen Untersuchungen wurde zudem festgestellt, dass eine orale oder intraportale Administration von Antigen effektiver Toleranz induziert als die intravenöse Gabe (Qian *et al.*, 1985; Rao *et al.*, 1988; Yoshimura *et al.*, 1990; Yoshifumi *et al.*, 1994; Morita *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 2000). Die intraportale Gabe von Spender-Alloantigen ruft zumeist keine Immunantwort hervor, wohingegen eine intravenöse Applikation eine Sensibilisierung des Empfängers zur Folge hat (Triger *et al.*, 1973) oder sogar zur hyperakuten Abstoßung des Allotransplantats führt (Nakano *et al.*, 1992). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine bevorzugte Anreicherung von Spender-Antigen in der Leber eine einzigartige Immunantwort gegen das Transplantat hervorruft (Nagano *et al.*, 1993). Die Leber scheint also bestimmte immunmodulatorische Funktionen zu besitzen, was zuerst von Chase und Sulzberger nachgewiesen – man spricht auch von Chase-Sulzberger-Effekt - und später von Cantor und Dumont bestätigt wurde (Sulzberger, 1930; Chase, 1946; Cantor und Dumont, 1967). Aus diesem Grund und wegen der Ergebnisse bei intravenöser Gabe wurde eine intraportale Infusion der MS Leberzellen durchgeführt. Die Tiere vertrugen diese Art der Applikation von Spender-Antigen gut, auch eine mehrmalige Gabe auf diese Weise war möglich. Um die Zirkulation oder Absiedelung der MS-Leberzellen nach intraportaler Infusion im Empfängerorganismus zu analysieren, wurde eine RT-PCR etabliert.

4.2.3.2 Überprüfung der Zirkulation oder Absiedlung der Donor-Zellen

Da die zur Infusion von Donor-Antigen verwendete MS Leberzellsuspension neben T-Zellen und B-Zellen auch Hepatozyten, Kupfer'sche Sternzellen und dendritische Zellen enthält, die in der Lage sind das Komplementprotein C3 zu synthetisieren, wurde eine speziesspezifische RT-PCR auf C3 etabliert, um die MS Zellen nach Infusion in der Ratte zu verfolgen. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus Leber oder aus dem nach Serumgewinnung übrig gebliebenen Blutkuchen gewonnen, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und diese dann für eine PCR auf Ratten oder MS C3 eingesetzt.

Um aus frischer Leber Gesamt-RNA von guter Qualität zu isolieren, musste die Leberzellsuspension vor der RNA-Isolation etwa 3 Stunden bei 4°C inkubiert werden. Wurde auf diesen Inkubationsschritt verzichtet, war die gewonnene RNA stark degradiert. Dies kann damit zusammenhängen, dass während der Zellpräparation durch Zerstörung einzelner Zellen auch RNAsen freigesetzt wurden, die während der Inkubationszeit ihre Aktivität verlieren.

Der Besitz eines Poly-A-Schwanzes an eukaryonter RNA wurde bei der folgenden Reversen Transkription zur Synthese von cDNA benutzt. Diese cDNA wurde dann in einer PCR mit den als speziesspezifisch identifizierten Primerkombinationen MH67/MH69 bzw. MH64/MH66 zur Amplifikation von DNA-Sequenzen aus der α -Kette von MS bzw. Ratten C3 eingesetzt.

Nach einmaliger intraportaler Infusion von MS Leberzellen konnte zu verschiedenen Zeitpunkten in Leber oder Blut der Ratten mit der etablierten RT-PCR kein C3 vom Spender nachgewiesen werden. Dies kann an einer zu geringen Sensitivität der Methode liegen, die zudem durch Gabe von Leflunomid noch weiter sank. Oder aber die Zellen sind nach Injektion in den Empfänger nicht mehr in der Lage ihre RNA-Synthese aufrechtzuerhalten. Mit den konstruierten Primern wäre eine Analyse auf DNA-Ebene hinsichtlich des Verbleibes der infundierten Zellen möglich.

4.2.3.3 Transplantatüberleben nach Schema zur Induktion von Toleranz

Durch die Kombination von B-Zell- und T-Zellsuppression, transienter Depletion der NK-Zellen und Gabe von Donor-Antigen (Tab. 2, Gruppen H, K und L) wurde in dekomplementierten Lewis Ratten ein verlängertes Transplantatüberleben von 78,6 Stunden erreicht (Gruppe H), wobei ein Tier sogar 5 Tage lang ein funktionsfähiges MS Herz aufwies. Mit dem eingesetzten Regime konnte das Transplantatüberleben im Vergleich zur Behandlung ohne Leberzellinfusion und Depletion der NK-Zellen (Gruppe G, 47 Stunden) verdoppelt werden. Bemerkenswert ist, dass in den Transplantaten in der Immunhistologie keine NK-Zellen zu finden sind. Die beobachtete starke Infiltration mit Makrophagen liefert einen Hinweis auf eine (IgM-) und Komplement-unabhängigen Aktivierung dieser Zellpopulation.

Die in die C6-defizienten PVG/C6- Ratten transplantierten MS Herzen (Gruppe L) wurden nach 33 Stunden abgestoßen, keines der Transplantate überlebte länger als 48 Stunden. Hier konnte die bei Lewis Ratten der Gruppe H erzielte Verlängerung des Transplantatüberlebens nicht erreicht werden. Die Transplantate der PVG/C6- Tiere wiesen im Gegensatz zu denen der Lewis Tiere (Gruppe H) in der Histologie C3-Ablagerungen auf. Dies wurde bereits in PVG/6- Tieren ohne das Toleranz-induzierende Regime beobachtet (Gruppe I). Die Beteiligung der Aktivierung der vorderen Abschnitte der Komplementkaskade in C6-defizienten Tieren an der Gewebs-

schädigung des Xenotransplantats und dessen Abstoßung wurde bereits gezeigt (Brauer RB *et al.*, 1993).

Wurde hingegen das tolerogene Regime mit B- und T-Zellsuppression, NK-Zell-Depletion und Donor-Antigengabe in PVG/C6- Ratten der Gruppe K durchgeführt, die im Gegensatz zu den PVG/C6- Ratten der Gruppe L zum Zeitpunkt und nach der Transplantation wie die Lewis Ratten der Gruppe H durch Gabe von CVF dekomplementiert wurden, konnte das Transplantat-überleben auf durchschnittlich 103 Stunden erhöht werden. Immerhin 3 der 5 Tiere überlebten über 100 Stunden, ein Tier zeigte sogar ein Überleben von mehr als 9 Tagen. Zwei dieser Tiere starben mit palpierbarem Herzschlag, so dass weniger die Abstoßungsreaktionen gegen das „Fremdorgan“ als vielmehr die Nebenwirkungen der immunsuppressiven Medikation, wie Anämie mit sinkendem Hämatokrit-Wert, den Tod der Tiere verursachte.

Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben im Gegensatz zu den Transplantaten der PVG/C6- Ratten ohne zusätzliche Dekomplementierung (Gruppe L) keine C3-Ablagerungen.

Unter Verwendung von C6- bzw. C9-spezifischen Antikörpern, die mit den entsprechenden Komplementproteinen von Ratten kreuzreagieren (Baker *et al.*, 1989), konnten C6- und C9-Ablagerungen auf den abgestoßenen Transplantaten in den PVG/C6- Ratten ohne Behandlung mit CVF (Gruppe L) im Gegensatz zu den Transplantaten aus den PVG/C6- Tieren mit zusätzlicher Dekomplementierung durch CVF (Gruppe K) detektiert werden. Da der C6-Defekt in den PVG/C6- Tieren vollständig ist, wie im hämolytischen Test auch von anderen Arbeitsgruppen bereits gezeigt wurde (Leenaerts *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1997b), haben die Empfänger diesen Defekt mit Hilfe des Transplantats korrigieren können. Durch Untersuchungen wurde belegt, dass die Leber der Hauptsyntheseort für Komplementfaktoren ist. So konnte auch in PVG/C6- Ratten nach Transplantation einer Leber aus Komplement-kompetenten PVG Ratten (PVG/C+) innerhalb von 7 Tagen die C6-Defizienz korrigiert werden (Brauer *et al.*, 1994). Aber es existieren auch extrahepatische Quellen für Komplementproteine. So konnte beispielsweise nach Knochenmarkstransplantation von PVG/C+ auf PVG/C6- Ratten etwa 10% der in den Spendern vorhandenen C6-Spiegel wiederhergestellt werden (Brauer *et al.*, 1995). Eine Möglichkeit der C6-Korrektur nach Transplantation ist die Produktion von Komplementfaktoren durch das Transplantat. Untersuchungen haben gezeigt, dass kultivierte Endothelzellen des Menschen in der Lage sind, Komplement zu produzieren (Ueki *et al.*, 1987; Warren *et al.*, 1987). Auch der Komplementfaktor C6 wird *in vitro* von humanen Endothelzellen der Umbelikalvene (HUVEC: human umbilical vein endothelial cells) gebildet (Lin *et al.*, 1997b). Die in dieser Arbeit bereits getroffene Hypothese für das konkordante Hamster/Ratte Modell, dass der C6-Defekt in PVG Ratten durch das Transplantat ausgeglichen werden kann, wird durch unsere Arbeit im diskordanten System bestätigt.

Durch Gabe von CVF nach Transplantation des MS Herzens in PVG/C6- Ratten wurden diese C6 und C9 Ablagerungen nicht beobachtet und ein verlängertes Transplantatüberleben beobachtet.

4.2.3.4 Analyse der XNA und der zirkulierenden B-Zellen unter dem zur Induktion von Toleranz eingesetzten Behandlungsschema

Zur Überprüfung der Effektivität der B-Zellsuppression durch Splenektomie und Leflunomid auch nach Infusion mit Spender-Antigen wurden die XNA aus dem Serum der Tiere aus den Gruppen H, K und L zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Während die Infusion mit MS Leberzellen in nicht immunsupprimierten Tieren (Gruppe M) zu einem starken Anstieg der XNA sowohl vom IgM- und etwas verzögert auch vom IgG-Isotyp bewirkten, führte die während des Regimes zur Induktion von B- und NK-Zell-Toleranz eingesetzte Immunsuppression auch unter Donor-Antigengabe zur effektiven Reduktion der zirkulierenden Antikörper und inhibierte zudem auch die Bildung induzierter Antikörper gegen MS Antigene.

Das zur B-Zellsuppression eingesetzte Leflunomid hemmt die T-Zell-unabhängige Bildung von XNA des IgM-Isotyps vor allem durch Reduktion von CD5+ B-Lymphozyten (Lin *et al.*, 1998a) und blockiert zudem die Induktion solcher Antigene durch die Inhibition der Expression induzierbarer Antigene wie E- und P-Selektin (Lin *et al.*, 1998b). Der Anteil von B-Zellen (CD45+) und insbesondere von CD5+ positive B-Zellen (CD45+ CD5+) innerhalb der Lymphozyten wurde bei Lewis (Gruppe O) und PVG/C6- Ratten (Gruppe P) durchflußzytometrisch analysiert. Die Tiere hatten wie die Tiere der Gruppen H (Lewis) und M (PVG/C6-) eine Kombination aus Splenektomie, B- und T-Zellsuppression, Depletion der NK-Zellen durch anti-asialo GM1 sowie eine Infusion mit MS Leberzellen erhalten (vgl. Tab. 3, S. 76).

Vor Behandlungsbeginn wiesen beide Rattenstämme gleich viele B-Zellen (CD45) im peripheren Blut auf (15%). Durch Splenektomie und tägliche Gabe des B-Zellsuppressivums Leflunomid kam es zu einer Zunahme der zirkulierenden B-Zellen innerhalb der Lymphozyten, die bei den PVG/C6- Ratten signifikant war. Dies kann durch Entfernen des lymphatischen Organs Milz erklärt werden, in das die B-Zellen aus dem Knochenmark einwandern. Die bei PVG/C6- Ratten beobachtete stärkere Zunahme der B-Zellen im Vergleich zu den Lewis Tieren könnte auf einer größeren Rolle der Milz bei diesem Rattenstamm beruhen. Auf der anderen Seite besteht auch die Möglichkeit, dass der beobachtete Anstieg der zirkulierenden B-Zellen innerhalb der Lymphozyten auch auf eine größere Sensitivität der restlichen Zellen gegenüber der Immunsuppression beruht und es dadurch zu einer scheinbaren Zunahme von B-Zellen kommt. Durch Fortsetzung der Immunsuppression, jetzt auch mit täglicher Gabe von CsA, und trotz Spender-Antigengabe sank der prozentuale Anteil der B-Zellen innerhalb der Lymphozyten beider Rattenstämme, wobei die Reduktion bei den PVG/C6- Ratten verzögert und nicht so effektiv ausfiel

wie bei den Lewis Tieren. So waren bei den Lewis Tieren etwa 4 Wochen nach Behandlungsbeginn die B-Zellen um etwa die Hälfte signifikant reduziert, während bei den PVG/C6 Ratten gerade der Ausgangswert wieder erreicht wurde.

Hinsichtlich der CD5+ B-Zellen gab es zwischen den beiden Rattenstämmen signifikante Unterschiede. Vor Behandlungsbeginn konnten bei PVG/C6- Ratten etwa doppelt so viele CD5+ B-Zellen detektiert werden wie bei den Lewis Tieren, was mit der Beobachtung einer durchschnittlich höheren OD im XNA-ELISA bei Seren von PVG/C6- Tieren übereinstimmt. Durch Splenektomie und tägliche Gabe von Leflunomid sank der Anteil der CD5+ B-Zellen bei beiden Gruppen. Dieser Trend zeigte allerdings keine Signifikanz. Während der immunsuppressiven Behandlung bis zum Tag 10 sanken die CD5+ B-Zellen bei beiden Rattenstämmen signifikant um etwa 70 bis 76% bezüglich ihres Ausgangswertes ab. Ob das Vorhandensein eines Xenotransplantates – das ja bei den Tieren der Gruppen H und M am Tag 0 eingesetzt wurde – einen Einfluss auf die B-Zell-Spiegel im Serum durch das immunsuppressive Schema hat, konnte in diesem Versuchsansatz nicht geklärt werden

Lin *et al.* (1999) stellten durch eine 4-wöchige Gabe des B-Zellsuppressivums Leflunomid eine Reduktion der CD5+B-Zellen von etwa 3,8 % auf 0,5%, also um etwa 85% bei Nacktratten fest. In PVG/C6-Ratten erzielten sie ebenfalls nach 4-wöchiger Behandlung mit Leflunomid bzw. Leflunomid in Kombination mit CsA mit anschließender Transplantation eine Reduktion der CD5+ B-Zellen um 70 bis 80% (Lin *et al.*, 1998a), was mit unseren Werten vergleichbar ist.

4.2.3.5 Analyse der NK-Zellen unter dem zur Induktion von Toleranz eingesetzten Behandlungsschema

Zur Induktion von spezifischer NK-Zell-Toleranz wurde eine transiente NK-Zell-Depletion mit dem anti-asialo GM1 (ASGM1) Serum durchgeführt. Das Antiserum ASGM1 eliminiert in Anwesenheit von Komplement *in vitro* und *in vivo* selektiv die NK-Zellen (Kumagai *et al.*, 1982; Kasai *et al.*, 1981). Da es auch in C6 defizienten PVG/C6 Ratten eingesetzt werden sollte, wurde in diesem Fall zur Vervollständigung des Komplementsystems zusammen mit MS Serum appliziert, um die Depletion der NK-Zellen zu gewährleisten. Wir haben MS Serum und nicht Ratten-serum gewählt, um einen weiteren Antigenschub in den Tieren zusätzlich zur Infusion mit MS Leberzellen zu leisten. Die Depletion der NK-Zellen und die Kinetik ihres Wiederauftretens wurden durchflußzytometrisch verfolgt bei den Lewis (Gruppe O) und PVG/C6-Ratten (Gruppe P), die analog zu den Tieren der Gruppen H und L behandelt worden waren. Auffallend war zunächst bei unbehandelten Tieren, dass PVG/C6- Ratten etwa doppelt so viele NK-Zellen im peripheren Blut aufwiesen wie Lewis Ratten. Eine mögliche Erklärung ist, dass als Ausgleich zum C6-Defekt ein anderer Mechanismus der natürlichen Abwehr kompensatorisch verstärkt ist.

So besitzen auch T-Zell defiziente Nacktratten einen etwa 3 bis 5 mal höheren NK-Zell-Anteil als euthymische Ratten (Reynolds *et al.*, 1982).

Alleine durch Splenektomie und tägliche Gabe von Leflunomid sanken die NK-Zellen bei den PVG/C6- Ratten signifikant um etwa 77%. Bei den Lewis Tieren fiel die Reduktion geringer aus. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Milz an der Reifung der aus dem Knochenmark abstammenden NK-Zellen beteiligt ist und bei den PVG/C6- Tieren eventuell eine größere Rolle spielt. Zum anderen wirkt Leflunomid als *de-novo*-Pyrimidin-Synthese-Inhibitor auf die Produktion aller Zellen einschließlich NK-Zellen und die bei PVG/C6- Ratten vorhandenen NK-Zellen sind sensibler gegenüber dieser Substanz.

Zwei Tage nach Gabe des ASGM1 Antiserums waren bei beiden Gruppen die NK-Zellen um 100% (Lewis) bzw. 98% (PVG/C6-) signifikant reduziert. Lin *et al.* (1997a) beobachteten innerhalb von 24 Stunden nach Injektion des anti-ASGM1 Serums eine NK-Zell-Depletion unter 7% und nach weiteren 48 Stunden eine totale Depletion in Nacktratten, die zudem noch einen 3- bis 5-fach höheren NK-Zell-Anteil im Vergleich zu euthymischen Ratten besitzen (Reynolds *et al.*, 1982). Es ist durchaus möglich, dass bei den von uns eingesetzten PVG/C6- Tieren bereits die höchste Reduktion der NK-Zellen am Tag 2 nach Gabe des ASGM1 Serums überschritten war. Eine weitere Möglichkeit wäre die unvollständige Depletion der vom mAk 3.2.3 detektierten Zellen. Im Gegensatz zu Lin *et al.* (1997a) wurde in dieser Arbeit ein anderer Antikörper (mAk 3.2.3, Chambers *et al.*, 1989) zur Detektion eingesetzt, als das den Oberflächenrezeptor ASGM1 von NK-Zellen erkennende Antiserum zur Depletion. Die Epitope der beiden Antikörper sind auf NK-Zellen und auch auf zytotoxischen T-Zellen exprimiert (Stitz *et al.*, 1986). Dies kann bedeuten, dass nach Färbung der Zellen mit mAk 3.2.3 die zytotoxischen T-Zellen der PVG/C6- Ratten einen Hintergrund trotz vollständiger Depletion der NK-Zellen bei der durchflußzytometrischen Analyse verursachen.

Die Überprüfung der NK-Zellzahl im peripheren Blut ergab eine stetige Zunahme ab Tag -3 vor der Herztransplantation während des gesamten Beobachtungszeitraums, bis am Tag +10 die Werte nach Splenektomie und 6-tägiger Behandlung mit Leflunomid (Tag -15) erreicht waren. Die NK-Zellen regenerierten sich also nach Depletion wieder, wanderten aber wie die histologischen Untersuchungen der abgestoßenen Transplantate zeigten nicht in das MS Organ ein. Um die eventuell entstandene Toleranz der NK-Zellen gegen MS Gewebe zu analysieren, wurde mit diesen wieder regenerierten NK-Zellen ein Zytotoxizitätstest durchgeführt.

Zytotoxizitätstests werden häufig eingesetzt, um die lytische Aktivität von NK-Zellen gegen verschiedene Zielzellen zu evaluieren. Obwohl neuere Methoden zur Bestimmung der lytischen Aktivität beschrieben sind (Blomberg *et al.*, 1986; Horan und Kappler, 1977; Papa *et al.*, 1988; Vargas-Cortes *et al.*, 1983), wird als Standardtest immer noch die Freisetzung von radioaktivem Chrom (^{51}Cr) in den Zellkulturüberstand als Marker für die Aktivität der NK-Zellen herangezogen (Brunner *et al.*, 1968). ^{51}Cr ist ein Radiosiotop, das bei Zerfall zur Freisetzung von γ -Strahlen mit

einer Energie von 0,323 MeV und von β -Strahlung mit einer Energie von 0,01 MeV führt (Levi, 1963). Dadurch kann die Freisetzung des Radioisotops innerhalb einer bestimmten Zeit als Maß für die Anzahl der von NK-Zellen lysierten, mit Cr^{51} markierten Zielzellen herangezogen werden.

Als Zielzellen wurden zum einen zur Kontrolle der NK-Zellaktivität die Mausmyelom Zelllinie YAC1 und zur Überprüfung der speziesspezifischen Lyse von Zielzellen mit Concanavalin A (Con A) stimulierte MS- und Maus Lymphoblasten verwendet. Con A ist ein Lektin aus der Schwertbohne *Canavalia ensiformis*, das speziell an D-Mannosyl- und D-Glucosyl Reste von Glykolipiden und -proteinen bindet und als polyklonales Mitogen T-Lymphozyten zur Proliferation anregt. Diese Proliferation kann durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin analysiert werden. In Vorversuchen wurden so die zur Proliferation von T-Lymphozyten aus der Milz von MS geeignete Con A-Konzentration und Inkubationsdauer überprüft. Dabei erwiesen sich die in Vorversuchen im Mikrotitermaßstab als optimal bestimmten Con A-Konzentrationen für die Stimulation einer größeren Zellmenge in entsprechend mehr Medium in Zellkulturflaschen als ungeeignet. Dies kann auf die unterschiedliche Dichte der Zellen und somit veränderte Zell-Zell-Kontakte zurückgeführt werden.

Wurden die regenerierten NK-Zellen aus den Lewis Ratten (Gruppe O) und PVG/C6- Ratten (Gruppe P), die analog zu den Tieren der Gruppen H und K behandelt worden waren, in einem Zytotoxizitätstest gegenüber den 3 verschiedenen Zielzellen (YAC1, Con A stimulierte MS und Maus Lymphoblasten) eingesetzt, konnte bei den PVG/C6- Tieren neben der Lyse der YAC1-Zellen eine signifikant höhere Lyse der MS Blasten im Vergleich zu den Maus Blasten festgestellt werden. Bei den Lewis Tieren zeigten sich diese Unterschiede aufgrund der geringen Fallzahl nicht. Der bei den PVG/C6- Ratten gewonnene Befund spricht für eine NK-Zell-Toleranz gegen MS Zellen, wenn man in Betracht zieht, dass unter demselben Regime ohne NK-Zell-Depletion eine höhere Lyse der MS Blasten als der Maus Blasten festgestellt wurde. Diese Kontrolle wurde bisher jedoch nur an einem Tier durchgeführt und bedarf weiterer Versuche, um diese Hypothese zu bestätigen.

Wie oben schon erwähnt deuten die Ergebnisse des Chromfreisetzungstests in Verbindung mit der Kinetik der NK-Zellen nach transienter Depletion und der Immunhistologie deuten auf eine NK-Zell-Toleranz gegenüber MS Gewebe hin. Nach transienter Depletion regenerieren sich die NK-Zellen wieder, wandern aber nicht in das Transplantat ein und zeigen zudem im Zytotoxizitätstest eine geringere Aktivität gegen MS-Blasten als gegen Maus Blasten, d.h. die verminderte Reaktivität der NK-Zellen reicht aus, eine Einwanderung in das Transplantat zu verhindern. Während der Regenerationsphase treffen die NK-Zellen auf Spender-Antigen, erkennen es möglicherweise als selbst und zeigen gegenüber dem Spender eine reduzierte lytische Aktivität. Die von der Arbeitsgruppe M. Waer gezeigte, vollständig reduzierte NK-Zell-Aktivität gegen Donorzellen unter einem ähnlichen Toleranz induzierendem Regime im konkordanten oder semi-

diskordanten Hamster/Ratte Modell (Lin *et al.*, 1998b; Ji *et al.*, 1999, Xia *et al.*, 2000) konnte in der diskordanten Situation MS/Ratte nicht nachvollzogen werden.

In der gleichen Arbeitsgruppe wurde das von ihnen im konkordanten und semikonkordanten Hamster/Ratte Modell entwickelte tolerogene Regime auch auf die diskordante Situation MS/Ratte übertragen (Xia *et al.*, 2000), allerdings ohne Erfolg. Die regenerierten NK-Zellen sind in der Immunhistologie des abgestoßenen Transplantats zu finden und zeigen eine Zytotoxizität gegenüber mit Con A stimulierten MS Blasten. Während Xia *et al.* (2000) als Spender-Antigen 1,5 ml heparinisieretes MS-Vollblut intravenös injizierten, haben wir Leberzellen über die Pfortader injiziert. Wie bereits erwähnt, ist aus der Allotransplantation die tolerogene Potenz der Leber bekannt (Kamada *et al.*, 1981). Eine wahrscheinliche Ursache ist, dass das Organ eine potente hämatopoetische Aktivität besitzt und über eine große Anzahl potentiell tolerogener, Antigen-präsentierender Zellen, insbesondere dendritische Zellen verfügt (Thomson und Lu, 1999).

4.3 Ausblick

In weiteren Untersuchungen gilt es zu prüfen, ob die Herkunft und Applikationsweise des Spender-Antigens Auswirkungen auf das zytotoxische Verhalten von regenerierten NK-Zellen hat. Dazu sollen die bisher verwendeten Antigenquellen wie Herzzellen, Vollblut oder Leberzellen sowohl intravenös als auch intraportal injiziert werden. In der Folge soll analysiert werden, welche Zellpopulation zur Induktion von NK-Zell-Toleranz essentiell ist.

In allen bisher durchgeführten diskordanten Transplantationsexperimenten wurde trotz Komplementdepletion, B-, T- und NK-Zell-Inhibition eine unveränderte Infiltration mit Makrophagen gefunden. Die Rolle der Makrophagen bei der Abstoßung kann durch temporäre Depletion mit in Liposomen eingekapseltem Clodronat (Dichloromethylen-Biphosphonat, Lip-Cl2MBP) analysiert werden. Im Gegensatz zu dem ebenfalls zur Blockade der Phagozytose durch Makrophagen eingesetztem Gadoliniumchlorid (Lázár, 1993; Hardonk *et al.*, 1992; Rüttinger *et al.*, 1996) führt Lip-Cl2MBP zu einer Inhibition der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α (Brisseau *et al.*, 1994; van Rooijen und Sanders, 1997). Durch eine einmalige intravenöse Injektion dieser Substanz können die ortsständigen Makrophagen der Milz, der Leber und der mesenterischen Lymphknoten innerhalb von 48 Stunden depletiert werden, wobei eine Repopulation nach 5 bis 7 Tagen stattfindet (van Rooijen *et al.*, 1990). Der Einsatz von Clodronat im konkordanten Hamster/Ratte Modell in Kombination mit T-Zellsuppression führte zur Verlängerung der Transplantatüberlebensdauer und zu einer deutlichen Verbesserung des morphologischen Zustandes des Transplantates (Takayama *et al.*, 2000). Auch im diskordanten Modell MS/PVG/C6- Ratte wurde die Substanz erfolgreich zur Verlängerung des Transplantatüberle-

bens eingesetzt (Wu *et al.*, 2000). Bisher wurde allerdings noch nicht untersucht, welchen Einfluss eine Kombination aus Makrophagen und NK-Zell-Depletion auf das Transplantat hat. Nicht zuletzt ist noch zu analysieren, ob auch in der diskordanten Situation die Induktion „protektiver“ Gene wie A20, Bcl-2, Bcl-X_L oder HO-1 auf den Endothelien des Transplantats durch Einsatz eines immunsuppressiven Behandlungsschemas möglich ist. Dadurch wären die Endothelzellen vor einer Aktivierung geschützt und es käme zum Zustand der Akkomodation, in dem das Xenotransplantat trotz vorhandener Antikörper und Komplementproteine nicht abgestoßen wird.

Wird durch weitere Veränderung des immunsuppressiven Regimes eine weitere Verlängerung der Transplantatfunktion erzielt, kann dieses Behandlungsschema auch bei der orthotopen Lebertransplantation angewendet und in der Folge die physiologischen Kompatibilitäten im MS/Ratte Modell nach Xenotransplantation analysiert werden.

5. Literaturverzeichnis

- Åkerström, B and Bjorck, L (1989) Protein L: an immunoglobulin light chain-binding bacterial protein. Characterization of binding and physicochemical properties. *J.Biol.Chem.* **264**:19740.
- Åkerström, B, Nilson, B H, Hoogenboom, H R and Bjorck, L (1994) On the interaction between single chain Fv antibodies and bacterial immunoglobulin-binding proteins. *J.Immunol.Methods* **177**:151.
- Alexandre, G P, Squifflet, J P, De Bruyere, M, Latinne, D, Reding, R, Gianello, P, Carlier, M and Pirson, Y (1987) Present experiences in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts. *Transplant.Proc.* **19**:4538.
- Anthuber, M, Farkas, S, Rihl, M, Menger, M D, Jauch, K W, Schildberg, F W and Messmer, K (1996) Conditioning of liver grafts by donor bolus pretreatment with epoprostenol. *Transplantation* **62**:13.
- Arthur, R P and Mason, D (1986) T cells that help B cell responses to soluble antigen are distinguishable from those producing interleukin 2 on mitogenic or allogeneic stimulation. *J.Exp.Med.* **163**:774.
- Atkinson, J P, Oglesby, T J, White, D, Adams, E A and Liszewski, M K (1991) Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor. *Clin.Exp.Immunol.* **86 Suppl 1**:27-30:27.
- Auchincloss, H J and Sachs, D H (1998) Xenogeneic transplantation. *Annu.Rev.Immunol.* **16**:433-70:433.
- Ausubel, F M; Brent, R, Kingston, R E, Moore, D D, Scidman, J G, Smith, J A and Struhl, K (1999) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons., Inc.
- Avrameas, S and Ternynck, T (1993) The natural autoantibodies system: between hypotheses and facts. *Mol.Immunol.* **30**:1133.
- Bach, F H, Turman, M A, Vercellotti, G M, Platt, J L and Dalmasso, A P (1991) Accommodation: a working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting. *Transplant.Proc.* **23**:205.

- Bach, F H, Robson, S C, Winkler, H, Ferran, C, Stuhlmeier, K M, Wrighton, C J and Hancock, W W (1995) Barriers to xenotransplantation [see comments]. *Nat.Med.* **1**:869.
- Bach, F H, Winkler, H, Ferran, C, Hancock, W W and Robson, S C (1996) Delayed xenograft rejection. *Immunol.Today* **17**:379.
- Bach, F H, Ferran, C, Soares, M, Wrighton, C J, Anrather, J, Winkler, H, Robson, S C and Hancock, W W (1997a) Modification of vascular responses in xenotransplantation: inflammation and apoptosis [see comments]. *Nat.Med.* **3**:944.
- Bach, F H, Ferran, C, Hechenleitner, P, Mark, W, Koyamada, N, Miyatake, T, Winkler, H, Badrichani, A, Candinas, D and Hancock, W W (1997b) Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat.Med.* **3**:196.
- Bader, A, Knop, E, Böker, K, Frühauf, N, Schüttler, W, Oldhafer, K, Burkhard, R, Pichlmayr, R and Sewing, K F (1995) A novel bioreactor design for *in vitro* reconstruction of *in vivo* liver characteristics. *Artif. Organs* **19**:368.
- Baker, P J, Ochi, R F, Schulze, M, Johnson, R J, Campbell, C and Couser, W G (1989) Depletion of C6 prevents development of proteinuria in experimental membranous nephropathy in rats. *Am.J.Pathol.* **135**:185.
- Ballow, M, Day, N K and Good, R A (1973) Effect of cobra venom factor on the local GVH reaction. I. Partial characterization of a cytotoxic factor from cobra venom for rat lymphocytes. *J.Immunol.* **110**:354.
- Balner, H (1974) Choice of animal species for modern transplantation research. *Transplant.Proc.* **6**:19.
- Barrett, R W, Cwirla, S E, Ackerman, M S, Olson, A M, Peters, E A and Dower, W J (1992) Selective enrichment and characterization of high affinity ligands from collections of random peptides on filamentous phage. *Anal. Biochem.* **204**:357.
- Bartlett, R R, Dimitrijevic, M, Mattar, T, Zielinski, T, Germann, T, Rude, E, Thoenes, G H, Kuchle, C C, Schorlemmer, H U and Bremer, E (1991) Leflunomide (HWA 486), a novel immunomodulating compound for the treatment of autoimmune disorders and reactions leading to transplantation rejection. *Agents Actions* **32**:10.

- Bartlett, R R, Campion, G, Musikic, P, Schleyerbach, R, Zielinski, T and Schorlemmer, H U (1994) Leflunomide: a novel immunomodulating drug. In: Lewis, A J and Furst, D E (Eds.) *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. Marcel Dekker Inc., New York, p.349.
- Beck, B N, Gillis, S and Henney, C S (1982) Display of the neutral glycolipid ganglio-n-tetraosylceramide (asialo GM1) on cells of the natural killer and T lineages. *Transplantation* **33**:118.
- Begent, R H, Verhaar, M J, Chester, K A, Casey, J L, Green, A J, Napier, M P, Hope-Stone, L D, Cushen, N, Keep, P A, Johnson, C J, Hawkins, R E, Hilson, A J and Robson, L (1996) Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nat.Med.* **2**:979.
- Beukelman, C J, Aerts, P C, Van Dijk, H and Willers, J M (1987) A one-step isolation procedure for phospholipase A₂-free cobra venom factor by fast protein liquid chromatography. *J.Immunol.Methods* **97**:119.
- Bird, R E, Hardman, K D, Jacobson, J W, Johnson, S, Kaufman, B M, Lee, S M, Lee, T, Pope, S H, Riordan, G S and Whitlow, M (1988) Single-chain antigen-binding proteins [published erratum appears in *Science* 1989 Apr 28;244(4903):409]. *Science* **242**:423.
- Bitter-Suermann, D and Köhl, J (1997) Komplementsystem. In Gemsa, D, Kalden, J R and Resch, K (Eds.) *Immunologie*. Georg Thieme Verlag. p. 70.
- Blakely, M L, Van der Werf, W J, Berndt, M C, Dalmaso, A P, Bach, F H and Hancock, W W (1994) Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transplantation* **58**:1059.
- Blomberg, K, Granberg, C, Hemmila, I and Lovgren, T (1986) Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. *J.Immunol.Methods* **86**:225.
- Borel, J F, Feurer, C, Gubler, H U and Stahelin, H (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* **6**:468.
- Boyden, S V (1966) Natural antibodies and the immune response. *Adv.Immunol.* **5**:1-28:1.
- Brauer, R B, Baldwin, W M, III, Daha, M R, Pruitt, S K and Sanfilippo, F (1993) Use of C6-deficient rats to evaluate the mechanism of hyperacute rejection of discordant cardiac xenografts. *J.Immunol.* **151**:7240.

- Brauer, R B, Baldwin, W M, III, Wang, D, Horwitz, L R, Hess, A D, Klein, A S and Sanfilippo, F (1994) Hepatic and extrahepatic biosynthesis of complement factor C6 in the rat. *J.Immunol.* **153**:3168.
- Brauer, R B, Lam, T T, Wang, D, Horwitz, L R, Hess, A D, Klein, A S, Sanfilippo, F and Baldwin, W M, III (1995) Extrahepatic synthesis of C6 in the rat is sufficient for complement-mediated hyperacute rejection of a guinea pig cardiac xenograft. *Transplantation* **59**:1073.
- Brauer, R B, Baldwin, W M, III, Wang, D, Pruitt, S K, Klein, A S and Sanfilippo, F (1996) Functional activity of anti-C6 antibodies elicited in C6-deficient rats reconstituted by liver allografts. Ability to inhibit hyperacute rejection of discordant cardiac xenografts. *Transplantation* **61**:588.
- Brisseau, G F, Kresta, A, Schouten, D, Bihnen, J M, Shek, P N, Fok, E and Rotstein, O D (1994) Unilammellar liposomes modulate secretion of tumor necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Antimikrob. Agents. Chemother.* **38**:2671.
- Brunner, K T, Mauel, J, Cerottini, J C and Chapuis, B (1968) Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells *in vitro*; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* **14**:181.
- Buonomano, R, Tinguely, C, Rieben, R, Mohacsi, P J and Nydegger, U E (1999) Quantitation and characterization of anti-Gal α 1-3Gal antibodies in sera of 200 healthy persons. *Xenotransplantation.* **6**:173.
- Busch, G J, Martins, A C, Hollenberg, N K, Wilson, R E and Colman, R W (1975) A primate model of hyperacute renal allograft rejection. *Am.J.Pathol.* **79**:31.
- Cairns, T, Gustavsson, M, Goldberg, L, Steen, L, Strokan, V, Samuelsson, B and Taube, D (1996) Identification of Forssman as a major guinea pig xenoantigen. *Transplant.Proc.* **28**:575.
- Calmus, Y, Ayani, E, Cardoso, J, Chereau, C, Kahan, A, Houssin, D and Weill, B (1993) Target antigens of hyperacute xenogeneic rejection in the rat to guinea pig to rat discordant combinations. *Transplantation* **56**:778.
- Calne, R Y (1970) Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant.Proc.* **2**:550.

- Candinas, D, Bach, F H and Hancock, W W (1996a) Delayed xenograft rejection in complement-depleted T-cell-deficient rat recipients of guinea pig cardiac grafts. *Transplant.Proc.* **28**:678.
- Candinas, D, Lesnikoski, B A, Robson, S C, Scesney, S M, Otsu, I, Miyatake, T, Marsh, H C J, Ryan, U S, Hancock, W W and Bach, F H (1996b) Soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor in discordant xenotransplantation. *Transplant.Proc.* **28**:581.
- Candinas, D, Belliveau, S, Koyamada, N, Miyatake, T, Hechenleitner, P, Mark, W, Bach, F H and Hancock, W W (1996c) T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection. *Transplantation* **62**:1920.
- Candinas, D, Belliveau, S, Koyamada, N, Miyatake, T, Hechenleitner, P, Mark, W, Bach, F H and Hancock, W W (1996d) T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection. *Transplantation* **62**:1920.
- Candinas, D, Lesnikoski, B A, Robson, S C, Miyatake, T, Scesney, S M, Marsh, H C, Jr., Ryan, U S, Dalmaso, A P, Hancock, W W and Bach, F H (1996e) Effect of repetitive high-dose treatment with soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor on discordant xenograft survival. *Transplantation* **62**:336.
- Cantor, H M and Dumont, A E (1967) Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* **215**:744.
- Caplan, A L (1992) Is xenografting morally wrong? *Transplant.Proc.* **24**:722.
- Carter, P, Bedouelle, H and Winter, G (1985) Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* **13**:4431.
- Cary, N, Moody, J, Yannoutsos, N, Wallwork, J and White, D (1993) Tissue expression of human decay accelerating factor, a regulator of complement activation expressed in mice: a potential approach to inhibition of hyperacute xenograft rejection. *Transplant.Proc.* **25**:400.
- Casali, P and Notkins, A L (1989) CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire [see comments]. *Immunol.Today* **10**:364.

- Casey, J L, Keep, P A, Chester, K A, Robson, L, Hawkins, R E and Begent, R H (1995) Purification of bacterially expressed single chain Fv antibodies for clinical applications using metal chelate chromatography. *J.Immunol.Methods* **179**:105.
- Celli, S, Valdivia, L A, Fung, J J and Kelly, R H (1997) Early recipient-donor switch of the complement type after liver xenotransplantation. *Immunol.Invest* **26**:589.
- Celli, S, Valdivia, L A, Kelly, R H, Sun, H, Tsugita, M, Pan, F, Rao, A S, Demetris, A J, Fung, J J and Starzl, T E (1995) Mechanisms of protection from humoral rejection by a xenografted liver. *Transplant.Proc.* **27**:300.
- Chambers, W H, Vujanovic, N L, DeLeo, A B, Olszowy, M W, Heberman, R B and Hiserodt, J C (1989) Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* **169**:1373.
- Chase, M W (1946) Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. *Proc. Soc. Exp. Med.* **61**:257.
- Cherwinski, H M, Cohn, R G, Cheung, P, Webster, D J, Xu, Y Z, Caulfield, J P, Young, J M, Nakano, G and Ransom, J T (1995) The immunosuppressant leflunomide inhibits lymphocyte proliferation by inhibiting pyrimidine biosynthesis. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **275**:1043.
- Chikaraishi, T, Ishikura, H, Seki, T, Koyanagi, T and Yoshiki, T (1995) Effect of 15-deoxyspergualin (DSG) on rat kidney allograft: immunological mechanisms implicated in prolonged survival. *J.Urol.* **154**:2197.
- Chomczynski, P and Sacchi, N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**:156.
- Chong, A S, Huang, W, Liu, W, Luo, J, Shen, J, Xu, W, Ma, L, Blinder, L, Xiao, F, Xu, X, Clardy, C, Foster, P and Williams, J A (1999) *In vivo* activity of leflunomide: pharmacokinetic analyses and mechanism of immunosuppression. *Transplantation* **68**:100.
- Chopek, M W, Simmons, R L and Platt, J L (1987) ABO-incompatible kidney transplantation: initial immunopathologic evaluation. *Transplant.Proc.* **19**:4553.
- Clackson, T, Hoogenboom, H R, Griffiths, A D and Winter, G (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**:624.

- Colcher, D, Pavlinkova, G, Beresford, G, Booth, B J, Choudhury, A and Batra, S K (1998) Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *Q.J.Nucl.Med.* **42**:225.
- Collins, B H, Chari, R S, Magee, J C, Harland, R C, Lindman, B J, Logan, J S, Bollinger, R R, Meyers, W C and Platt, J L (1994) Mechanisms of injury in porcine livers perfused with blood of patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* **58**:1162.
- Collins, B H, Cotterell, A H, McCurry, K R, Alvarado, C G, Magee, J C, Parker, W and Platt, J L (1995) Cardiac xenografts between primate species provide evidence for the importance of the alpha-galactosyl determinant in hyperacute rejection. *J.Immunol.* **154**:5500.
- Colotta, F, Sciacca, F L, Sironi, M, Luini, W, Rabiet, M J and Mantovani, A (1994) Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am.J.Pathol.* **144**:975.
- Cozzi, E and White, D J (1995) The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat.Med.* **1**:964.
- Crafa, F, Gugenheim, J, Saint-Paul, M C, Lapalus, F, Damais, A and Mouiel, J (1993) Role of nonparenchymal liver cells in guinea pig to rat hepatic xenotransplantation. *Eur.Surg.Res.* **25**:303.
- Cramer, A, Cwirla, S and Stemmer, W P (1996) Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nat.Med.* **2**:100.
- Dalmaso, A P, Vercellotti, G M, Platt, J L and Bach, F H (1991) Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* **52**:530.
- Dalmaso, A P, He, T and Benson, B A (1996) Inhibition of complement-mediated porcine endothelial cell cytotoxicity by human IgM natural antibody. *Transplant.Proc.* **28**:535.
- Davis, E A, Lam, T T, Qian, Z, Ibrahim, S, Baldwin, W M, III and Sanfilippo, F P (1995) Inhibition of neutrophil adhesion and the membrane attack complex of complement synergistically prolongs cardiac xenograft survival. *J.Heart Lung Transplant.* **14**:973.

- Delriviere, L D, Havaux, X, Gibbs, P and Gianello, P R (1998) Basic anatomical and physiological differences between species should be considered when choosing combinations for use in models of hepatic xenotransplantation: an investigation of the guinea pig-to-rat combination. *Transplantation* **66**:112.
- Dower, W J, Miller, J F and Ragsdale, C W (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**:6127.
- Ember, J A, Jagels, M A and Hugli, T E (1998) Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. In Volanakis, J E and Frank, M M (Eds.) The human complement system in health and disease. Marcel Dekker Inc. p. 241.
- Engemann, R (1985) Technique for orthotopic rat liver transplantation. In Thiede, A, Deltz, E, Engemann, R and Hamelmann, H (Eds.) Microsurgical models in rats for transplantation research. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 69
- Flexner, S and Noguchi, H (1903) Anti-complementary activity of cobra venom. *J. Exp. Med.* **6**:277.
- Flores, H C, Leventhal, J R, Gruber, S A, Figueroa, J, Platt, J L, Manivel, C, Bach, F H, Matas, A J and Bolman, R M, III (1992) Natural antibody production can be inhibited by 15-deoxyspergualin in a discordant xenograft model. *Transplant.Proc.* **24**:714.
- Friedl, H P, Till, G O, Ryan, U S and Ward, P A (1989) Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J.* **3**:2512.
- Fryer, J P, Leventhal, J R, Dalmaso, A P, Chen, S, Simone, P A, Goswitz, J J, Reinsmoen, N L and Matas, A J (1995) Beyond hyperacute rejection. Accelerated rejection in a discordant xenograft model by adoptive transfer of specific cell subsets. *Transplantation* **59**:171.
- Fung, J, Rao, A and Starzl, T (1997) Clinical trials and projected future of liver xenotransplantation. *World J.Surg.* **21**:956.
- Galili, U, Rachmilewitz, E A, Peleg, A and Flechner, I (1984) A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J.Exp.Med.* **160**:1519.
- Galili, U, Shohet, S B, Kobrin, E, Stults, C L and Macher, B A (1988) Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J.Biol.Chem.* **263**:17755.

- Galili, U (1993) Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans [see comments]. *Immunol.Today* **14**:480.
- Gerlach, J C, Schnoy, N, Vienken, J, Smith, M and Neuhaus, P (1996) Comparison of hollow fibre membranes for hepatocyte immobilisation in bioreactors. *Int. J. Artif. Organs* **19**:610.
- Gerritsen, M E and Bloor, C M (1993) Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J.* **7**:523.
- Giles, G R, Boehmig, H J, Lilly, J, Amemiya, H, Takagi, H, Coburg, A J, Hathaway, W E, Wilson, C B, Dixon, F J and Starzl, T E (1970) Mechanism and modification of rejection of heterografts between divergent species. *Transplant.Proc.* **2**:522.
- Goodman, D J, Von Albertini, M, Willson, A, Millan, M T and Bach, F H (1996) Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells. *Transplantation* **61**:763.
- Gorczynski, R M, Chan, Z, Chung, S, Cohen, Z, Levy, G, Sullivan, B and Fu, X M (1994) Prolongation of rat small bowel or renal allograft survival by pretransplant transfusion and/or by varying the route of allograft venous drainage. *Transplantation* **58**:816.
- Gorczynski, R M, Fu, X M, Chung, S, Sullivan, B and Chen, Z (1995) Manipulation of xenogeneic skin and/or renal graft survival in the rat-mouse concordant combination by portal vein pretransplant transfusion. *Transpl.Immunol.* **3**:321.
- Greene, S, Watanabe, K, Braatz-Trulson, J and Lou, L (1995) Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide. *Biochem.Pharmacol.* **50**:861.
- Groth, C G (1998) Xenotransplantation. The viral issue. *Lancet* **352 Suppl 4**:SIV26:SIV26.
- Güteryüz, S (1998) Generierung und Charakterisierung rekombinanter Antikörper gegen die Komplementproteine C5 und C5a des Meerschweinchens. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Georg-August-Universität, Göttingen.
- Habu, S, Fukui, H, Shimamura, K, Kasai, M, Nagai, Y, Okumura, K and Tamaoki, N (1981) *In vivo* effects of anti-asialo GM1. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J.Immunol.* **127**:34.

- Hammer, C (1989) Preformed natural antibodies (PNAB) and possibilities of modulation of hyperacute xenogeneic rejection (HXAR). *Transplant.Proc.* **21**:522.
- Hancock, W W, Miyatake, T, Koyamada, N, Kut, J P, Soares, M, Russell, M E, Bach, F H and Sayegh, M H (1997a) Effects of leflunomide and deoxyspergualin in the guinea pig-->rat cardiac model of delayed xenograft rejection: suppression of B cell and C-C chemokine responses but not induction of macrophage lectin [published erratum appears in *Transplantation* 1997 Oct 27;64(8):1225]. *Transplantation* **64**:696.
- Hancock, W W (1997b) Delayed xenograft rejection. *World J.Surg.* **21**:917.
- Hancock, W W, Buelow, R, Sayegh, M H and Turka, L A (1998) Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat.Med.* **4**:1392.
- Hanna, S M, Williams, G T, Van Den Berg, C W and Morgan, B P (1998) Characterization *in vitro* and *in vivo* of the pig analogue of human CD59 using new monoclonal antibodies. *Immunology* **95**:450.
- Hardonk, M J, Dijkhuis, F W, Hulstaert, C E and Koudstaal, J (1992) Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J.Leukoc.Biol.* **52**:296.
- Haughton, G, Arnold, L W, Whitmore, A C and Clarke, S H (1993) B-1 cells are made, not born. *Immunol.Today* **14**:84.
- Hawkins, R E, Russell, S J and Winter, G (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J.Mol.Biol.* **226**:889.
- Henkart, P A (1985) Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu.Rev.Immunol.* **3**:31-58:31.
- Herzenberg, L A, Kantor, A B and Herzenberg, L A (1992) Layered evolution in the immune system. A model for the ontogeny and development of multiple lymphocyte lineages. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **651**:1-9:1.
- Hofer, E, Duchler, M, Fuad, S A, Houchins, J P, Yabe, T and Bach, F H (1992) Candidate natural killer cell receptors. *Immunol.Today* **13**:429.
- Holzknacht, Z E and Platt, J L (2000) The fine cytokine line between graft acceptance and rejection [news] [see comments]. *Nat.Med.* **6**:497.

- Horan, P K and Kappler, J W (1977) Automated fluorescent analysis for cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* **18**:309.
- Huston, J S, Levinson, D, Mudgett-Hunter, M, Tai, M S, Novotny, J, Margolies, M N, Ridge, R J, Brucoleri, R E, Haber, E and Crea, R (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**:5879.
- Huston, J S, George, A J, Adams, G P, Stafford, W F, Jamar, F, Tai, M S, McCartney, J E, Oppermann, H, Heelan, B T, Peters, A M, Houston, L L, Bookman, M A, Wolf, E J and Weiner, L M (1996) Single-chain Fv radioimmunotargeting. *Q.J.Nucl.Med.* **40**:320.
- Hutton, R A and Warrell, D A (1993) Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood Rev.* **7**:176.
- Ihrcke, N S, Wrenshall, L E, Lindman, B J and Platt, J L (1993) Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol.Today* **14**:500.
- Ihrcke, N S and Platt, J L (1996) Shedding of heparan sulfate proteoglycan by stimulated endothelial cells: evidence for proteolysis of cell-surface molecules. *J.Cell Physiol* **168**:625.
- Inverardi, L and Pardi, R (1994) Early events in cell-mediated recognition of vascularized xenografts: cooperative interactions between selected lymphocyte subsets and natural antibodies. *Immunol.Rev.* **141:71-93**:71.
- Inverardi, L, Clissi, B, Stolzer, A L, Bender, J R, Sandrin, M S and Pardi, R (1997) Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues. *Transplantation* **63**:1318.
- Irving, R A, Kortt, A A and Hudson, P J (1996) Affinity maturation of recombinant antibodies using *E. coli* mutator cells. *Immunotechnology* **2**:127.
- Jakobs, F M, Davis, E A, Qian, Z, Liu, D Y, Baldwin, W M, III and Sanfilippo, F (1997) The role of CD11b/CD18 mediated neutrophil adhesion in complement deficient xenograft recipients. *Clin.Transplant.* **11**:516.
- Jakobs, F M, Davis, E A, White, T, Sanfilippo, F and Baldwin, W M, III (1998) Prolonged discordant xenograft survival by inhibition of the intrinsic coagulation pathway in complement C6-deficient recipients. *J.Heart Lung Transplant.* **17**:306.

- Jamieson, S W (1974) Xenograft hyperacute rejection. A new model. *Transplantation* **17**:533.
- Ji, P, Xia, G, Sefrioui, H, Rutgeerts, O, Segers, C and Waer, M (1999) Induction of T-independent xenotolerance in a semi-discordant hamster-to-presensitized, nude rat model. *Transplantation* **68**:130.
- Jin, T, Sugiura, K, Ishikawa, J, Lee, S, Morita, H, Nagahama, T and Ikehara, S (1999) Persistent tolerance induced after portal venous injection of allogeneic cells plus cyclophosphamide treatment. *Immunobiology* **200**:215.
- Jörns, A, Tiedge, M and Lenzen, S (1999) Nutrient-dependant distribution of insulin and glucokinase in rat pancreatic beta cells. *Virchow Arch.* **434**:75.
- Kabat, E A, Wu, T T, Perry, H M, Gottesmann, K S and Foeller, C (1991) Sequences of proteins of immunological interest. **5**:
- Kagi, D, Ledermann, B, Burki, K, Seiler, P, Odermatt, B, Olsen, K J, Podack, E R, Zinkernagel, R M and Hengartner, H (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice [see comments]. *Nature* **369**:31.
- Kaji, H, Platt, J L, Sutherland, D E, Mori, C, Shiota, K, Inoue, K and Imamura, M (1995) A new harvesting method prolongs survival of cardiac xenografts from guinea pig to rat. *Transplantation* **60**:202.
- Kamada, N, Davies, H S and Roser, B (1981) Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature* **292**:840.
- Kantor, A B and Herzenberg, L A (1993) Origin of murine B cell lineages. *Annu.Rev.Immunol.* **11**:501-38:501.
- Kaplon, R J, Platt, J L, Kwiatkowski, P A, Edwards, N M, Xu, H, Shah, A S, Masroor, S and Michler, R E (1995) Absence of hyperacute rejection in pig-to-primate orthotopic pulmonary xenografts. *Transplantation* **59**:410.
- Kasai, M, Iwamori, M, Nagai, Y, Okumura, K and Tada, T (1980) A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur.J.Immunol.* **10**:175.
- Kasai, M, Yoneda, T, Habu, S, Maruyama, Y, Okumura, K and Tokunaga, T (1981) *In vivo* effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. *Nature* **291**:334.

- Kasaian, M T, Ikematsu, H and Casali, P (1992) Identification and analysis of a novel human surface CD5- B lymphocyte subset producing natural antibodies. *J.Immunol.* **148**:2690.
- Kawase, I, Urdal, D L, Brooks, C G and Henney, C S (1982) Selective depletion of NK cell activity *in vivo* and its effect on the growth of NK-sensitive and NK-resistant tumor cell variants. *Int.J.Cancer* **29**:567.
- Kay, J E and Benzie, C R (1984) Rapid loss of sensitivity of mitogen-induced lymphocyte activation to inhibition by cyclosporin A. *Cell Immunol.* **87**:217.
- Keller, R, Bachi, T and Okumura, K (1983) Discrimination between macrophage-and NK-type tumoricidal activities via anti-asialo GM1 antibody. *Exp.Cell Biol.* **51**:158.
- Kyes, P (1903) Lyse der roten Blutkörperchen durch Phospholipase A₂. *Berl. Klein. Wochenschr.* **40**:956.
- Kipriyanov, S M, Dubel, S, Breitling, F, Kontermann, R E, Heymann, S and Little, M (1995) Bacterial expression and refolding of single-chain Fv fragments with C- terminal cysteines. *Cell Biophys.* **26**:187.
- Klein, M, Geoghegan, J, Wangemann, R, Bockler, D, Schmidt, K and Scheele, J (1999) Preconditioning of donor livers with prostaglandin I₂ before retrieval decreases hepatocellular ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* **67**:1128.
- Klos, A, Ihrig, V, Messner, M, Grabbe, J and Bitter-Suermann, D (1988) Detection of native human complement components C3 and C5 and their primary activation peptides C3a and C5a (anaphylatoxic peptides) by ELISAs with monoclonal antibodies. *J.Immunol.Methods* **111**:241.
- Köhl, J (1997) The Anaphylatoxins. In Dodds, A W and Sim, R B (Eds.) *Complement: A Practical Approach*. Oxford University Press. p. 135.
- Köhl, J (1999) Antibodies from phage display libraries. *Biomedical Progress* **12**:65.
- Kozlowski, T, Shimizu, A, Lambrigts, D, Yamada, K, Fuchimoto, Y, Glaser, R, Monroy, R, Xu, Y, Awwad, M, Colvin, R B, Cosimi, A B, Robson, S C, Fishman, J, Spitzer, T R, Cooper, D K and Sachs, D H (1999) Porcine kidney and heart transplantation in baboons undergoing a tolerance induction regimen and antibody adsorption. *Transplantation* **67**:18.

- Kretzschmar, T, Aoustin, L, Zingel, O, Marangi, M, Vonach, B, Towbin, H and Geiser, M (1996) High-level expression in insect cells and purification of secreted monomeric single-chain Fv antibodies. *J.Immunol.Methods* **195**:93.
- Kumagai, K, Itoh, K, Suzuki, R, Hinuma, S and Saitoh, F (1982) Studies of murine large granular lymphocytes. I. Identification as effector cells in NK and K cytotoxicities. *J.Immunol.* **129**:388.
- Lachmann, P J and Halbwegs, L (1975) The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. *Clin.Exp.Immunol.* **21**:109.
- Lachmann, P J, Halbwegs, L, Gewurz, A and Gewurz, H (1976) Purification of cobra venom factor from phospholipase A contaminant. *Immunology* **31**:961.
- Laemmli, U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680.
- Lambrigts, D, Sachs, D H and Cooper, D K (1998) Discordant organ xenotransplantation in primates: world experience and current status. *Transplantation* **66**:547.
- Lawson, J H, Daniels, L J and Platt, J L (1997) The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation. *Transplant.Proc.* **29**:884.
- Lázár, G (1973) The reticuloendothelial blocking effect of rare earth metals in rats.*J. Reticuloendothel. Soc.* **13**:231.
- Leenaerts, P L, Stad, R K, Hall, B M, Van Damme, B J, Vanrenterghem, Y and Daha, M R (1994) Hereditary C6 deficiency in a strain of PVG/c rats. *Clin.Exp.Immunol.* **97**:478.
- Leventhal, J R, Flores, H C, Gruber, S A, Figueroa, J, Platt, J L, Manivel, J C, Bach, F H, Matas, A J and Bolman, R M (1992a) Evidence that 15-deoxyspergualin inhibits natural antibody production but fails to prevent hyperacute rejection in a discordant xenograft model. *Transplantation* **54**:26.
- Leventhal, J, Figueroa, J, Flores, H, Platt, J L and Bach, F H (1992b) Measurement of natural antibody in a discordant xenograft model. *Transplant.Proc.* **24**:455.
- Leventhal, J R, Matas, A J, Sun, L H, Reif, S, Bolman, R M, Dalmaso, A P and Platt, J L (1993a) The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to- rat model. *Transplantation* **56**:1.

- Leventhal, J R, Dalmaso, A P, Cromwell, J W, Platt, J L, Manivel, C J, Bolman, R M and Matas, A J (1993b) Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* **55**:857.
- Levi, H (1963) Documenta Geigy- Tables Scientifiques. JR Geigy Departement Pharamceutique, Basel, p.277.
- Lin, S S, Kooyman, D L, Daniels, L J, Daggett, C W, Parker, W, Lawson, J H, Hoopes, C W, Gullotto, C, Li, L, Birch, P, Davis, R D, Diamond, L E, Logan, J S and Platt, J L (1997a) The role of natural anti-Gal alpha 1-3Gal antibodies in hyperacute rejection of pig-to-baboon cardiac xenotransplants. *Transpl.Immunol.* **5**:212.
- Lin, Y, Vandeputte, M and Waer, M (1996) Difference in tolerization of T-independent and T-dependent xenoantibody formation after cardiac xenotransplantation in rats. *Transplant.Proc.* **28**:741.
- Lin, Y, Vandeputte, M and Waer, M (1997a) Natural killer cell- and macrophage-mediated rejection of concordant xenografts in the absence of T and B cell responses. *J.Immunol.* **158**:5658.
- Lin, Y, Vandeputte, M and Waer, M (1997b) Factors involved in rejection of concordant xenografts in complement-deficient rats. *Transplantation* **63**:1705.
- Lin, Y, Vandeputte, M and Waer, M (1998a) Suppression of T-independent IgM xenoantibody formation by leflunomide during xenografting of hamster hearts in rats. *Transplantation* **65**:332.
- Lin, Y, Ji, P, Xia, G, Vandeputte, M and Waer, M (1998b) Blockade of induced xenoantigen expression prevents rejection after retransplantation of accommodated hamster-to-rat heart xenografts. *Transplantation* **65**:340.
- Lin, Y, Goebels, J, Xia, G, Ji, P, Vandeputte, M and Waer, M (1998c) Induction of specific transplantation tolerance across xenogeneic barriers in the T-independent immune compartment. *Nat.Med.* **4**:173.
- Lin, Y, Soares, M P, Sato, K, Takigami, K, Csizmadia, E, Anrather, J and Bach, F H (1999) Rejection of hamster cardiac xenografts by rat CD4+ or CD8+ T cells. *Transplant.Proc.* **31**:959.

- Liu, C C, Perussia, B, Cohn, Z A and Young, J D (1986) Identification and characterization of a pore-forming protein of human peripheral blood natural killer cells. *J.Exp.Med.* **164**:2061.
- Logan, J S and Sharma, A (1999) Potential use of genetically modified pigs as organ donors for transplantation into humans. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **26**:1020.
- Mackman, N, Fowler, B J, Edgington, T S and Morrissey, J H (1990) Functional analysis of the human tissue factor promoter and induction by serum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**:2254.
- Mackman, N, Brand, K and Edgington, T S (1991) Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J.Exp.Med.* **174**:1517.
- Malmqvist, M (1993) Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics. *Curr.Opin.Immunol.* **5**:282.
- Mantovani, A, Bussolino, F and Dejana, E (1992) Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J.* **6**:2591.
- McCurry, K R, Kooyman, D L, Alvarado, C G, Cotterell, A H, Martin, M J, Logan, J S and Platt, J L (1995) Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury [see comments]. *Nat.Med.* **1**:423.
- Miki, T, Goller, A, Rao, A, Wang, X, Yin, W Y, Tandin, A, Fung, J J, Starzl, T E and Valdivia, L A (1998) Tacrolimus enhances the immunosuppressive effect of cyclophosphamide but not that of leflunomide or mycophenolate mofetil in a model of discordant liver xenotransplantation. *Transplant.Proc.* **30**:1091.
- Miki, T, Subottin, V, Goller, A L, Tandin, A, Rao, A S, Fung, J J and Valdivia, L A (1999) Role of UW solution and sodium nitroprusside in reperfusion of liver xenografts from guinea pig to rat. *Xenotransplantation* **6**:117.
- Miyagawa, S, Hirose, H, Shirakura, R, Naka, Y, Nakata, S, Kawashima, Y, Seya, T, Matsumoto, M, Uenaka, A and Kitamura, H (1988) The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transplantation* **46**:825.

- Miyama, A, Kato, T, Horai, S, Yokoo, J and Kashiba, S (1975) Trypsin-activated complex of human factor B with cobra venom factor (CVF), cleaving C3 and C5 and generating a lytic factor for unsensitized guinea pig erythrocytes. I. Generation of the activated complex. *Biken.J.* **18**:193.
- Mollevi, D G, Jaurrieta, E, Ribas, Y, Hurtado, I, Serrano, T, Gomez, N, de Oca, J, Fiol, C and Figueras, J (2000) Liver xenotransplantation: changes in lipid and lipoprotein concentration after long-term graft survival. *J.Hepatol.* **32**:655.
- Mollnes, T E and Fiene, A E (1999) Xenotransplantation: how to overcome the complement obstacle? *Mol.Immunol.* **36**:269.
- Morita, H, Nakamura, N, Sugiura, K, Satoi, S, Sakakura, Y, Tu, W, Yoshida, K, Oda, M, Inoue, T, Inui, H, Nagahama, T, Kamiyama, Y and Ikehara, S (1999) Acceptance of skin allografts in pigs by portal venous injection of donor bone marrow cells. *Ann.Surg.* **230**:114.
- Morita, H, Sugiura, K, Nagahama, T, Sakakura, Y, Tu, W, Oda, M, Inoue, T, Inui, H, Taketani, S, Kamiyama, Y and Ikehara, S (2000) Acceptance of skin xenografts (from guinea pig to mice) by portal venous and intravenous injections of donor hemolymphoid cells. *Transplant.Proc.* **32**:293.
- Morris, R E (1995) Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. *Ther.Drug Monit.* **17**:564.
- Moses, R D, Pierson, R N, III, Winn, H J and Auchincloss, H, Jr. (1990) Xenogeneic proliferation and lymphokine production are dependent on CD4+ helper T cells and self antigen-presenting cells in the mouse. *J.Exp.Med.* **172**:567.
- Murase, N, Demetris, A J, Tanabe, M, Miyazawa, H, Valdivia, L A, Nakamura, K and Starzl, T E (1993) Effect of FK 506 and antiproliferative agents for heart and liver xenotransplantation from hamster to rat. *Transplant.Proc.* **25**:425.
- Murphy, B, Auchincloss, H, Jr., Carpenter, C B and Sayegh, M H (1996) T cell recognition of xeno-MHC peptides during concordant xenograft rejection. *Transplantation* **61**:1133.
- Nagaki, K, Iida, K, Okubo, M and Inai, S (1978) Reaction mechanisms of beta1H globulin. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* **57**:221.

- Nagano, H, Monden, M, Gotoh, M, Tanigawa, T, Tono, T, Nakano, Y and Mori, T (1993) Induction of unresponsiveness in rats after either intraportal injection of donor antigen or intravenous injection combined with splenectomy. *Transplantation* **56**:1468.
- Nakano, Y, Monden, M, Valdivia, L A, Gotoh, M, Tono, T and Mori, T (1992) Permanent acceptance of liver allografts by intraportal injection of donor spleen cells in rats. *Surgery* **111**: 668.
- Neethling, F A, Koren, E, Oriol, R, Richards, S V, Ye, Y, Kujundzic, M and Cooper, D K (1994) Immunoabsorption of natural antibodies from human serum by affinity chromatography using specific carbohydrates protects pig cells from cytotoxic destruction. *Transplant.Proc.* **26**:1378.
- Neri, D, Pini, A and Nissim, A (1998) Antibodies from phage display libraries as immunochemical reagents. *Methods Mol.Biol.* **80**:475.
- Neuhaus, P and Blumhardt G (1993) Extracorporeal liver perfusion: applications of an improved model for experimental studies of the liver. *Int. J. Artif. Organs* **16**:729.
- Niekrasz, M, Ye, Y, Rolf, L L, Zuhdi, N and Cooper, D K (1992) The pig as organ donor for man. *Transplant.Proc.* **24**:625.
- Nilson, B H, Solomon, A, Bjorck, L and Akerstrom, B (1992) Protein L from *Peptostreptococcus magnus* binds to the kappa light chain variable domain. *J.Biol.Chem.* **267**:2234.
- Ono, K and Lindsey, E S (1969) Improved technique of heart transplantation in rats. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* **57**:225.
- Oriol, R, Ye, Y, Koren, E and Cooper, D K (1993) Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation* **56**:1433.
- Osman, N, McKenzie, I F, Ostenried, K, Ioannou, Y A, Desnick, R J and Sandrin, M S (1997) Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Galalpha(1,3)Gal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:14677.
- Papa, S, Vitale, M, Mariani, A R, Roda, P, Facchini, A and Manzoli, F A (1988) Natural killer function in flow cytometry. I. Evaluation of NK lytic activity on K562 cell line. *J.Immunol.Methods* **107**:73.

- Perez de la Lastra JM, Hanna, S M and Morgan, B P (1999) Distribution of membrane cofactor protein (MCP/CD46) on pig tissues. Relevance To xenotransplantation. *Immunology* **98**:144.
- Perper, R J and Najarian, J S (1966) Experimental renal heterotransplantation. I. In widely divergent species. *Transplantation* **4**:377.
- Perper, R J and Najarian, J S (1967) Experimental renal heterotransplantation. 3. Passive transfer of transplantation immunity. *Transplantation* **5**:514.
- Platt, J L, Turman, M A, Noreen, H J, Fischel, R J, Bolman, R M and Bach, F H (1990a) An ELISA assay for xenoreactive natural antibodies. *Transplantation* **49**:1000.
- Platt, J L, Vercellotti, G M, Lindman, B J, Oegema, T R, Jr., Bach, F H and Dalmaso, A P (1990b) Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection. *J.Exp.Med.* **171**:1363.
- Platt, J L, Vercellotti, G M, Dalmaso, A P, Matas, A J, Bolman, R M, Najarian, J S and Bach, F H (1990c) Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunol.Today* **11**:450.
- Platt, J L, Fischel, R J, Matas, A J, Reif, S A, Bolman, R M and Bach, F H (1991) Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* **52**:214.
- Platt, J L (1992) Mechanisms of tissue injury in hyperacute xenograft rejection. *ASAIO J.* **38**:8.
- Plückthun, A (1991) Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnology (N.Y.)* **9**:545.
- Pober, J S and Cotran, R S (1990) The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* **50**:537.
- Porath, J, Carlsson, J, Olsson, I and Belfrage, G (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**:598.
- Pruitt, S K, Baldwin, W M, III, Marsh, H C, Jr., Lin, S S, Yeh, C G and Bollinger, R R (1991) The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute xenograft rejection. *Transplantation* **52**:868.

- Qiagen, T N (1998) The Qiaexpressionist. A Handbook for high-level expression and purification of 6 x His-tagged proteins.
- Qian, J H, Hashimoto, T, Fujiwara, H and Hamaoka, T (1985) Studies on the induction of tolerance to alloantigens: I. The abrogation of delayed-type hypersensitivity responses to alloantigens by portal venous inoculation with allogeneic cells. *J. Immunol.* **134**:3656.
- Randolph, G J, Beaulieu, S, Lebecque, S, Steinman, R M and Muller, W A (1998) Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking [see comments]. *Science* **282**:480.
- Rao, V K, Burris, D E, Gruel, S M, Sollinger, H W and Burlingham, W J (1988) Evidence that donor spleen cells administered through the portal vein prolong the survival of cardiac allografts in rats. *Transplantation* **45**:1145.
- Reding, R, Soares, M, Baranski, A, Nisol, F, Tomasi, J P, Jamart, J, Barker, A, Latinne, D, Lambotte, L and Bazin, H (1994) Preformed antibody and complement rebound after plasma exchange: analysis of immunoglobulin isotypes and effect of splenectomy. *Transpl.Immunol.* **2**:231.
- Reynolds, C W, Timonen, T T, Holden, H T, Hansen, C T and Herberman, R B (1982) Natural killer cell activity in the rat. Analysis of effector cell morphology and effects of interferon on natural killer cell function in the athymic (nude) rat. *Eur.J.Immunol.* **12**:577.
- Ritz, H (1912) Inaktivierung der Aktivierung des Komplementsystems durch Cobra Venom Faktor. *Z. Immunitätsforsch.* **13**:62.
- Rollins, S A, Matis, L A, Springhorn, J P, Setter, E and Wolff, D W (1995) Monoclonal antibodies directed against human C5 and C8 block complement-mediated damage of xenogeneic cells and organs. *Transplantation* **60**:1284.
- Rose, A G, Cooper, D K, Human, P A, Reichenspurner, H and Reichart, B (1991) Histopathology of hyperacute rejection of the heart: experimental and clinical observations in allografts and xenografts. *J.Heart Lung Transplant.* **10**:223.
- Rouvier, E, Luciani, M F and Golstein, P (1993) Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J.Exp.Med.* **177**:195.
- Rozga, J, Podesta, L, LePage, E, Morsiani, E, Moscioni, A D, Hoffmann, A, et al. (1994) A bioartificial liver to treat severe acute liver failure. *Ann. Surgery* **5**:538.

- Rüttinger, D, Vollmar, B, Wanner, G A and Messmer, K (1996) *In vivo* assessment of hepatic alterations following gadolinium chloride-induced Kupffer cell blockade. *J.Hepatol.* **25**:960.
- Saadi, S and Platt, J L (1998) Immunology of xenotransplantation. *Life Sci.* **62**:365.
- Saadi, S and Platt, J L (1999) Role of complement in xenotransplantation. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **26**:1016.
- Sahu, A and Lambiris, J D (2000) Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics. *Immunopharmacology* **49**:133.
- Saiki, R K, Gelfand, D H, Stoffel, S, Scharf, S J, Higuchi, R, Horn, G T, Mullis, K B and Erlich, H A (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487.
- Sandrin, M S and McKenzie, I F (1994) Gal alpha (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies. *Immunol.Rev.* **141**:169-90:169.
- Sandrin, M S, Fodor, W L, Mouhtouris, E, Osman, N, Cohney, S, Rollins, S A, Guilmette, E R, Setter, E, Squinto, S P and McKenzie, I F (1995) Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity [see comments]. *Nat.Med.* **1**:1261.
- Sankary, H N, Yin, D P, Chong, A S, Ma, L L, Blinder, L, Shen, J K, Foster, P and Williams, J W (1998) FK506 treatment in combination with leflunomide in hamster-to-rat heart and liver xenograft transplantation. *Transplantation* **66**:832.
- Sato, M, Kawakami, K, Osawa, T and Toyoshima, S (1992) Molecular cloning and expression of cDNA encoding a galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin on mouse tumoricidal macrophages. *J.Biochem.(Tokyo)* **111**:331.
- Scarpati, E M and Sadler, J E (1989) Regulation of endothelial cell coagulant properties. Modulation of tissue factor, plasminogen activator inhibitors, and thrombomodulin by phorbol 12-myristate 13-acetate and tumor necrosis factor [published erratum appears in *J Biol Chem* 1990 Aug 25;265(24):14696]. *J.Biol.Chem.* **264**:20705.
- Scheringa, M, Blanker, R, Bemelman, M, Schraa, E, de Bruin, R, Bouwman, E, IJzermans, J and Marquet, R (1995a) Prolonged survival of guinea pig hearts in rats after combined antibody and complement depletion. *Transplant.Proc.* **27**:303.

- Scheringa, M, Schraa, E O, Bouwman, E, Van Dijk, H, Melief, M J, IJzermans, J N and Marquet, R L (1995b) Prolongation of survival of guinea pig heart grafts in cobra venom factor-treated rats by splenectomy. No additional effect of cyclosporine. *Transplantation* **60**:1350.
- Scherrer, L, Leventhal, J R, Matas, A J and Dalmaso, A P (1994) Evidence that rat xenoreactive antibodies recognize multiple protein antigens on guinea pig endothelial cells and platelets. *Transplantation* **58**:458.
- Schettino, E W, Chai, S K, Kasaian, M T, Schroeder, H W, Jr. and Casali, P (1997) VHDJH gene sequences and antigen reactivity of monoclonal antibodies produced by human B-1 cells: evidence for somatic selection. *J.Immunol.* **158**:2477.
- Schirmer, W J, Schirmer, J M, Naff, G B and Fry, D E (1988) Complement depletion alters the systemic and visceral hemodynamic response to endotoxemia. *Curr.Surg.* **45**:288.
- Schmoeckel, M, Bhatti, F N, Zaidi, A, Cozzi, E, Pino-Chavez, G, Dunning, J J, Wallwork, J and White, D J (1997) Xenotransplantation of pig organs transgenic for human DAF: an update. *Transplant.Proc.* **29**:3157.
- Schmoeckel, M, Bhatti, F N, Zaidi, A, Cozzi, E, Waterworth, P D, Tolan, M J, Pino-Chavez, G, Goddard, M, Warner, R G, Langford, G A, Dunning, J J, Wallwork, J and White, D J (1998) Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model [published erratum appears in *Transplantation* 1998 Oct 15;66(7):943]. *Transplantation* **65**:1570.
- Schraa, E O, Scheringa, M, Buchner, B, Marquet, R L and IJzermans, J N (1996) Limitations to the feasibility of discordant liver transplantation. *Transplant.Proc.* **28**:717.
- Schraa, E O, Marquet, R L and IJzermans, J N (1999) The fourth barrier. *Curr.Med.Res.Opin.* **15**:327.
- Settaf, A, Meriggi, F, Gane, P, Capron-Laudereau, M, Reynes, M, Rouger, P, Houssin, D and Bismuth, H (1989) [Rejection of discordant xenografts of the liver and heart]. *J.Chir (Paris)* **126**:365.
- Sharma, A, Okabe, J, Birch, P, McClellan, S B, Martin, M J, Platt, J L and Logan, J S (1996) Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fucosyltransferase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:7190.

- Shevach, E M (1985) The effects of cyclosporin A on the immune system. *Annu.Rev.Immunol.* **3:397-423:397.**
- Siemasko, K F, Chong, A S, Williams, J W, Bremer, E G and Finnegan, A (1996) Regulation of B cell function by the immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation* **61:635.**
- Sims, P J and Wiedmer, T (1991) The response of human platelets to activated components of the complement system. *Immunol.Today* **12:338.**
- Smyth, M J and Trapani, J A (1995) Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol.Today* **16:202.**
- Soares, M, Latinne, D, Elsen, M, Kinard, F, Reding, R, Lambotte, L, Otte, J B and Bazin, H (1992) Isotype characterization of rat preformed natural antibodies against guinea pig cells. *Transplant.Proc.* **24:451.**
- Soares, M P, Latinne, D, Elsen, M, Figueroa, J, Bach, F H and Bazin, H (1993) *In vivo* depletion of xenoreactive natural antibodies with an anti-mu monoclonal antibody. *Transplantation* **56:1427.**
- Soares, M, Lu, X, Havaux, X, Baranski, A, Reding, R, Latinne, D, Daha, M, Lambotte, L, Bach, F H and Bazin, H (1994) *In vivo* IgM depletion by anti-mu monoclonal antibody therapy. The role of IgM in hyperacute vascular rejection of discordant xenografts. *Transplantation* **57:1003.**
- Soares, M, Havaux, X, Van Beneden, R, Van der Werf, W J, Bach, F H, Bazin, H and Latinne, D (1995) Characterisation of rat anti-guinea pig circulating xenoreactive natural antibodies and secreting cells. *Transplant. Proc.* **27:282.**
- Soares, M P, Muniappan, A, Kaczmarek, E, Koziak, K, Wrighton, C J, Steinhauslin, F, Ferran, C, Winkler, H, Bach, F H and Anrather, J (1998) Adenovirus-mediated expression of a dominant negative mutant of p65/RelA inhibits proinflammatory gene expression in endothelial cells without sensitizing to apoptosis. *J.Immunol.* **161:4572.**
- Soin, B, Vial, C M and Friend, P J (2000) Xenotransplantation. *Br.J.Surg.* **87:138.**
- Starzl, T E, Ishikawa, M, Putnam, C W, Porter, K A, Picache, R, Husberg, B S, Halgrimson, C G and Schroter, G (1974) Progress in and deterrents to orthotopic liver transplantation, with special reference to survival, resistance to hyperacute rejection, and biliary duct reconstruction. *Transplant.Proc.* **6:129.**

- Starzl, T E, Fung, J, Tzakis, A, Todo, S, Demetris, A J, Marino, I R, Doyle, H, Zeevi, A, Warty, V and Michaels, M (1993) Baboon-to-human liver transplantation [see comments]. *Lancet* **341**:65.
- Stemmer, W P (1994) Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling [see comments]. *Nature* **370**:389.
- Stitz, L, Baenzinger, J, Pircher, H, Hengartner, H and Zinkernagel, R (1986) Effect of rabbit anti-asialo GM1 treatment *in vivo* or with anti-asialo GM1 plus complement *in vitro* on cytotoxic cell activities. *J. Immunol.* **136**:4674.
- Sulzberger, M B (1930) Arsphenamine hypersensitiveness in guinea pigs: II Experiments demonstrating the role of skin, both as originator and as site of hypersensitiveness. *Arch. Dermatol. Syphilol.* **22**:839.
- Sykes, M, Zhao, Y and Yang, Y G (1997) Tolerance induction for xenotransplantation. *World J.Surg.* **21**:932.
- Takayama, J, Koyamada, N, Abe, T, Hatsugai, K, Usuda, M, Ohkohchi, N and Satomi, S (2000) Macrophage depletion prevents accelerated rejection and results in long-term survival in hamster to rat cardiac xenotransplantation. *Transplant.Proc.* **32**:1016.
- Tanaka, M, Tamaki, T, Konoeda, Y, Kawamura, A, Takahashi, Y, Ishikura, H and Yoshiki, T (1999) Impaired recoloration of a discordant liver xenograft in the guinea pig-to-rat combination: physiological insults or immunological responses. *Transplantation* **68**:304.
- Tandin, A, Goller, A L, Miki, T, Lee, Y H, Kovscek, A M, Fung, J J, Starzl, T E and Valdivia, L A (2000) Concordant hamster-to-rat liver xenotransplantation leads to hyperlipidemia. *Transplant.Proc.* **32**:1109.
- Tavakoli, R, Michel, A, Cardoso, J, Ayani, E, Maillet, F, Fontaliran, F, Crougneau, S, Weill, B and Houssin, D (1993) Prolonged survival of guinea pig-to-rat heart xenografts using repeated low doses of cobra venom factor. *Transplant.Proc.* **25**:407.
- Teutsch, M, Higer, M, Wang, D and Wortis, H W (1995) Induction of CD5 on B and T cells is suppressed by cyclosporin A, FK-520 and rapamycin. *Int.Immunol.* **7**:381.
- Thomas, F T, Marchman, W, Carobbi, A, Araneda, D, Pryor, W and Thomas, J (1991) Immunobiology of the xenograft response: xenograft rejection in immunodeficient animals. *Transplant.Proc.* **23**:208.

- Thomson, A W and Lu, L (1999) Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol.Today* **20**:27.
- Towbin, H, Staehelin, T and Gordon, J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**:4350.
- Triger, D R, Cynamon, M H and Wright, R (1973) Studies on hepatic uptake of antigen. I. Comparison of inferior vena cava and portal vein routes of immunization. *Immunology* **25**:941.
- Trinchieri, G (1989) Biology of natural killer cells. *Adv.Immunol.* **47:187-376**:187.
- Ueki, A, Sai, T, Oka, H, Tabata, M, Hosokawa, K and Mochizuki, Y (1987) Biosynthesis and secretion of the third component of complement by human endothelial cells *in vitro*. *Immunology* **61**:11.
- Ulfvin, A, Backer, A E, Clausen, H, Hakomori, S, Rydberg, L, Samuelsson, B E and Breimer, M E (1993) Expression of glycolipid blood group antigens in single human kidneys: change in antigen expression of rejected ABO incompatible kidney grafts. *Kidney Int.* **44**:1289.
- United Kingdom Transplant Support Services Association (1998). *Transplant. Statistics*.
- United Network for Organ Sharing Richmond Virginia. World Web Site :www.unos.org.
- Vakeva, A P, Agah, A, Rollins, S A, Matis, L A, Li, L and Stahl, G L (1998) Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* **97**:2259.
- van Den Berg, C W and Morgan, B P (1994) Complement-inhibiting activities of human CD59 and analogues from rat, sheep, and pig are not homologously restricted. *J.Immunol.* **152**:4095.
- van Den Berg, C W, Perez de la Lastra JM, Llanes, D and Morgan, B P (1997) Purification and characterization of the pig analogue of human membrane cofactor protein (CD46/MCP). *J.Immunol.* **158**:1703.
- van Dixhoorn, M G, Timmerman, J J, Gijlswijk-Janssen, D J, Muizert, Y, Verweij, C, Discipio, R G and Daha, M R (1997) Characterization of complement C6 deficiency in a PVG/c rat strain. *Clin.Exp.Immunol.* **109**:387.

- van Rooijen, N, Kors, N, Ende, M and Dijkstra, C D (1990) Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res.* **260**:215.
- van Rooijen, N and Sanders, A (1997) Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind? *J.Leukoc.Biol.* **62**:702.
- Vargas-Cortes, M, Hellstrom, U and Perlmann, P (1983) Surface markers of human natural killer cells as analyzed in a modified single cell cytotoxicity assay on poly-L-lysine coated cover slips. *J.Immunol.Methods* **62**:87.
- Vaughan, T J, Williams, A J, Pritchard, K, Osbourn, J K, Pope, A R, Earnshaw, J C, McCafferty, J, Hodits, R A, Wilton, J and Johnson, K S (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library [see comments]. *Nat.Biotechnol.* **14**:309.
- Vercellotti, G M, Platt, J L, Bach, F H and Dalmaso, A P (1991) Neutrophil adhesion to xenogeneic endothelium via iC3b. *J.Immunol.* **146**:730.
- Vogel, C W and Muller-Eberhard, H J (1982) The cobra venom factor-dependent C3 convertase of human complement. A kinetic and thermodynamic analysis of a protease acting on its natural high molecular weight substrate. *J.Biol.Chem.* **257**:8292.
- Vogel, C W, Smith, C A and Muller-Eberhard, H J (1984) Cobra venom factor: structural homology with the third component of human complement. *J.Immunol.* **133**:3235.
- von Albertini, M A, Goodman, D J and Bach, F H (1996) Direct cell contact is required to induce expression of E-selectin and IL-8 secretion in pig endothelial cells by human natural killer cells. *Transplant.Proc.* **28**:608.
- von Zabern, I, Hinsch, B, Przyklenk, H, Schmidt, G and Vogt, W (1980) Comparison of *Naja n. naja* and *Naja h. haje* cobra-venom factors: correlation between binding affinity for the fifth component of complement and mediation of its cleavage. *Immunobiology* **157**:499.
- Ward, E S, Gussow, D, Griffiths, A D, Jones, P T and Winter, G (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli* [see comments]. *Nature* **341**:544.

- Ward, P A, Till, G O, Hatherill, J R, Annesley, T M and Kunkel, R G (1985) Systemic complement activation, lung injury, and products of lipid peroxidation. *J.Clin.Invest* **76**:517.
- Warren, H B, Pantazis, P and Davies, P F (1987) The third component of complement is transcribed and secreted by cultured human endothelial cells. *Am.J.Pathol.* **129**:9.
- Waterworth, P D, Cozzi, E, Tolan, M J, Langford, G, Braidley, P, Chavez, G, Dunning, J, Wallwork, J and White, D (1997) Pig-to-primate cardiac xenotransplantation and cyclophosphamide therapy. *Transplant.Proc.* **29**:899.
- Westenfelder, U, Schraven, B and Mannel, D N (1993) Characterization of monocyte-activating tumour cell membrane structures. *Scand.J.Immunol.* **38**:388.
- Whaley K.,North J. (1997) Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. In Dodds, A W and Sim, R B (Eds.) *Complement: A practical approach*.
- White, S A and Nicholson, M L (1999) Xenotransplantation. *Br.J.Surg.* **86**:1499.
- Winter, G and Milstein, C (1991) Man-made antibodies. *Nature* **349**:293.
- Wolf, E, Schernthaner, W, Muller, S and Brem, G (1999) [Xenotransplantation. Possibilities of animal breeding]. *Zentralbl.Chir* **124**:585.
- Wood, G S and Warnke, R (1981) Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J.Histochem.Cytochem.* **29**:1196.
- Wu, G, Korsgren, O, Zhang, J, Song, Z, van Rooijen, N and Tibell, A (2000) Pig islet xenograft rejection is markedly delayed in macrophage-depleted mice: a study in streptozotocin diabetic animals [In Process Citation]. *Xenotransplantation.* **7**:214.
- Xia, G, Ji, P, Rutgeerts, O and Waer, M (1999) Maintenance and reversibility of natural killer cell- and T cell-independent B lymphocyte xenotolerance in athymic nude rats [see comments]. *Transplantation* **68**:1181.
- Xia, G, Ji, P, Rutgeerts, O and Waer, M (2000) Natural killer cell- and macrophage mediated discordant guinea pig-->rat xenograft rejection in the absence of complement, xenoantibody and T cell immunity. *Transplantation* **70**:86.

- Xia, W, Fearon, D T, Moore, F D, Jr., Schoen, F J, Ortiz, F and Kirkman, R L (1992) Prolongation of guinea pig cardiac xenograft survival in rats by soluble human complement receptor type 1. *Transplant.Proc.* **24**:479.
- Xu, H S, Pruett, T L and Jones, R S (1994) Study of donor-recipient liver size match for transplantation. *Ann.Surg.* **219**:46.
- Xu, X, Williams, J W, Gong, H, Finnegan, A and Chong, A S (1996) Two activities of the immunosuppressive metabolite of leflunomide, A77 1726. Inhibition of pyrimidine nucleotide synthesis and protein tyrosine phosphorylation. *Biochem.Pharmacol.* **52**:527.
- Yamada, K, Sachs, D H and DerSimonian, H (1995) Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J.Immunol.* **155**:5249.
- Yang, W P, Green, K, Pinz-Sweeney, S, Briones, A T, Burton, D R and Barbas, C F (1995) CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol.Biol.* **254**:392.
- Yang, Y G, deGoma, E, Ohdan, H, Bracy, J L, Xu, Y, Iacomini, J, Thall, A D and Sykes, M (1998) Tolerization of anti-Gal α 1-3Gal natural antibody-forming B cells by induction of mixed chimerism. *J.Exp.Med.* **187**:1335.
- Ye, Y, Neethling, F A, Niekrasz, M, Koren, E, Richards, S V, Martin, M, Kosanke, S, Oriol, R and Cooper, D K (1994) Evidence that intravenously administered alpha-galactosyl carbohydrates reduce baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells (PK15) and transplanted pig hearts. *Transplantation* **58**:330.
- Yonehara, S, Ishii, A and Yonehara, M (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* **169**:1747.
- Yoshifumi, K, Olivier, F, Delphine, B, Issam, M and Henri, B (1994) Variable prolongation of cardiac allograft survival following intraportal administration of donor antigens. *Transplantation* **58**:527.
- Yoshimura, N, Matsui, S, Hamashima, T, Lee, C J, Ohsaka, Y and Oka, T (1990) The effects of perioperative portal venous inoculation with donor lymphocytes on renal allograft survival in the rat. I. Specific prolongation of donor grafts and suppressor factor in the serum. *Transplantation* **49**:167.

- Young, W W, Jr., Hakomori, S I, Durdik, J M and Henney, C S (1980) Identification of ganglio-N-tetraosylceramide as a new cell surface marker for murine natural killer (NK) cells. *J.Immunol.* **124**:199.
- Yu, P B, Holzknicht, Z E, Bruno, D, Parker, W and Platt, J L (1996) Modulation of natural IgM binding and complement activation by natural IgG antibodies: a role for IgG anti-Gal alpha1-3Gal antibodies. *J.Immunol.* **157**:5163.
- Zaidi, A, Schmoeckel, M, Bhatti, F, Waterworth, P, Tolan, M, Cozzi, E, Chavez, G, Langford, G, Thiru, S, Wallwork, J, White, D and Friend, P (1998) Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation* **65**:1584.

6. Anhang

6.1 Sequenzen der Primer zum Amplifizieren der scFvs

Nummer	Bezeichnung	Sequenz	bp-Position	Bemerkung
JK 61	Seq pelB	5'- ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GC-3'	40-62	sense Sequenzierprimer für pHEN1; setzt im pelB leader auf
JK77	Seq c-myc	5'-CAT TGC GGC CCC ATT CA-3'		reverser Sequenzierprimer für pHEN1; setzt im myc-taq auf, liest in V _L Kette
JK 52	Seq pCANTAB	5'-TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC-3'	2228-2247	sense Sequenzierprimer für pCANTAB6
AW1	Seq gIII	5'-GAA TTT TCT GTA TGA GG-3'	2404-2420	reverser Sequenzierprimer für pCANTAB6; setzt am Anfang des gene III auf

6.2 Sequenzen der Primer für RT-PCR auf Ratten bzw. MS C3

Nummer	Sequenz	bp-Position	Bemerkung
MH64	5'-CAC CCT CAT CAT CTA CCT AG-3'	4367-4386	sense Primer für Ratten C3
MH65	5'GGT CTA CTC CTA CTA CAA TC-3'	4475-4494	sense Primer für Ratten C3
MH66	5'-GCT GAT GAA CCT TCG TTC C-3'	4781-4798	reverser Primer für Ratten C3
MH67	5'-CAT CTA CCT GGA CAA GGT CTC-3'	4374-4394	sense Primer für MS C3
MH68	5'-CTG CCA CAA GGA CTT GTG C-3'	4554-4572	sense Primer für MS C3
MH69	5'-CCA TGT TCT CTG TGA AAG TG-3'	4986-5005	reverser Primer für MS C3
MH70	5'-GAT GTG GCT GAT GAA TCT GC-5'	4781-4800	reverser Primer für MS C3

6.3 DNA Sequenzen der scFvs gegen MS C5 (B3, H10, F11 und H10) und gegen MS C5a (D10)

6.3.1 Schwere Ketten

	10	20	30	40	50		
B3	-----	-----	CAAGT GAAGCTGGTG	GAGTCTGGGG	GAGGCTTAGT	35	
E10	-----	-----	GAGGT CCAGCTGCAG	CAGTCTGGGG	CTGAGCTGGT	35	
F11	-----	-----	CAGGT CCAGCTGCAG	CAGTCTGGGG	CAGAGGTTGT	35	
H10	-----	-----	GAGGT GAAGCTGGTG	GAATCTGGGG	GAGGCTTAGT	35	
D10	CAGCCGGCCA	TGGCCGAGGT	TCAGCTTCAG	CAGTCTGGGG	CTGCGCTGGC	50	
	60	70	80	90	100		
B3	GCAGCCTGGA	GGGTCCCTGA	AACTCTCCTG	TGCAGCCTCT	GGATTCACTT	85	
E10	GAGGTCTGGG	GCCTCAGTGA	AGATGTCCTG	CAAGGCTTCT	GGCTACACAT	85	
F11	GAAGCCAGGG	GCCTCARTCA	GGTTGTCCTG	CACAGCTTCT	GGCCTCGATA	85	
H10	GCAGCCTGGA	GGGTCCCGGA	AACTCTCCTG	TGCAGCCTCT	GGATTCACTC	85	
D10	AAGACCTGGG	GCTTCAGTGA	AGCTGTCCTG	CAGGGCCTCT	GGCTACACCT	100	
	110	120	130	140	150		
B3	TCAGT	AGTTA TGGCATGTCT	TGGTTTCGCC	AGACTCCAGA	CAAGAGGCTG	135	
E10	TTGCC	AGGTA CAATGTCCAT	TGGGTAAAAC	AGACACCTGG	ACAGGGCCTG	135	
F11	TTAAA	GACAC CTATATGCAC	TGGGTGAGGC	AGAGGCCTGA	ACAGGGCCTG	135	
H10	TCAGT	AACTT TGGAATGCAC	TGGGTTCGTC	AGGCTCCAGA	GAAGGGGCTG	135	
D10	TTAGT	AGTTA TTGGCTGCAG	TGGGTAAAAC	AGAGGCCTGG	ACAGGGTCTG	150	
CDR1							
	160	170	180	190	200		
B3	GAATTGGTCT	CA	ACCATTA	TAGTAATGGT	GGTAGCACCT	ATTATGCAGA	185
E10	GAATGGATTG	GA	TATATTTA	TCCTAGAGAC	GGTGATACTA	ACTACAATCA	185
F11	GAGTGGATTG	GA	ATGATTGA	TCCTGCGAAT	GGTTATACTA	AATATGACCC	185
H10	GAGTGGGTCG	CG	TACATGAG	TAGTGCCGGT	AGTACCATCT	ACTATGCAGA	185
D10	GAATGGATTG	GG	GCTTTTTA	TCCTGGAGAT	GGTGATACTC	GCTATAATCA	200

CDR2

	210	220	230	240	250	
B3	CAGTGTGAAG GGC	CGATTCA	CCATCTCCAG	AGACAGTGCC	AAGAACACCC	235
E10	GAAGTTCAAG GGC	AAGGCCA	CATTGACTGC	AGACACATCC	TCCAGCACAG	235
F11	GAAGTTCCAG GGC	AAGGCCA	CTATAATAGC	AGACACATTT	TCAGTAAAGT	235
H10	CACAGTGAAG GGC	CGATTCA	CCATCTCCAG	AGACGTTCCC	AAGAACGCC	235
D10	GAAGTTCAAG GGC	AAGGCCA	CAATGACTGC	AGATAAATCC	TCCACTACAG	250

	260	270	280	290	300	
B3	TGTACCTGCA	AATGAGCAGT	CTGAAGTCGG	AGGACACAGC	CATGTATTAC	285
E10	CCTACATGCA	GATCAGCAGC	CTGACATCTG	AAGACTCTGC	GGTCTATTTT	285
F11	CCTACCTGCA	GCTCAGCAGC	CGGACATCTG	AGGACACTGC	CGTCTATTAC	285
H10	TGTTCTGCA	AATGACCAGT	CTAAGGTCTG	AGGACACGGC	CATATATTTT	285
D10	CCTACATGCA	ACTCACCATC	TTGTCATCTG	AGGACTCTGC	GGTCTATTAC	300

	310	320	330	340	350	
B3	TGTGTAAGA	G AAAAGGGGTT	ACGAAGGTTT	GCTTACTGGG	GCCAAGGGAC	335
E10	TGTACAAGA	T CAAGGGATGC	TTATTACGTA	GGGGCTATGG	ACTTCTGGGG	335
F11	TGTGCTAGCG	AGGCTCCCCA	TGCTATGGAC	TTCTGGGGTC	ATGGAACCTC	335
H10	TGTGCAAGA	A ACTACGGTAG	TAGACCCTGG	TTTCCTTACT	GGGGCCAAGG	335
D10	TGTGCAAGA	T ATGGTGACTA	CCTCTATGGT	ATGGACTACT	GGGGTCAAGG	350

CDR3

	360	370	380	
B3	TCTGGTCACT	GTCTCTGCAG	GT	357
E10	TCAAGGAACC	TCAGTCACCG	TCTCCTCAGG	T 366
F11	AGTCACCGTC	TCCTCAGGT		354
H10	GACTCTGGTC	ACTGTCTCTGC	AGGT	360
D10	AACCTCAGTC	ACCGTCTCCT	CAGGT	375

6.3.2 Leichte Ketten

	10	20	30	40	50	
B3	GACATTGTGC	TGACACAGTC	TCCATCCTCC	CTGACTGTGA	CAGCAGGAGA	50
E10	GACATTGTAA	TGACACAGTC	TCAAAAATTC	ATGTCCACAT	CAGTAGGAGA	50
F11	GACATTGTGA	TGACACAGTC	TCAAAAATTC	ATGTCCACAT	CAGTAGGAGA	50
H10	GACATTGTGA	TGACACAGAC	TCAAAAATTC	ATGTCCACAT	CAGTAGGAGA	50
D10	GATGTTGTGA	TGACCCAGAC	TCCACTCTCC	CTGCCTGTCA	GTCTTGGAGA	50
	60	70	80	90	100	
B3	GAAGGTCACT	ATGAGCTGCA	AGTCCAGTCA	GAGTCTGTTA	AACAGTGGAA	100
E10	CAGGGTCAGC	GTCACCTGCA	AGGCCAGTCA	GAATGTGGGT	ACTAATGTAG	100
F11	CAGGGTCAGC	GTCACCTGCA	AGGCCAGTCA	GAATGTGGGT	ACTAATGTAG	100
H10	CAGGGTCAGC	GTCACCTGCA	AGGCCAGTCA	GAATGTGGGT	ACTAATGTAG	100
D10	TCAAGCCTCC	ATCTCTTGC	A GATCTAGTCA	GAGCCTTGTA	CACAGTAATG	100
	CDR1					
	110	120	130	140	150	
B3	ATCAAAAGAA	CTACTTGACC	TGGTACCAGC	AGAAACCAGG	GCAGCCTCCT	150
E10	CCTGGTATCA	ACAGAAACCA	GGGCAATCTC	CTAAAGCACT	GATTTACTCG	150
F11	CCTGGTATCA	ACAGAAACCA	GGGCAATCTC	CTAAAGCACT	GATTTACTCG	150
H10	CCTGGTATCA	ACAGAAACCA	GGGCAATCTC	CTAAAGCACT	GATTTACTCG	150
D10	GAAACACCTA	TTTACATTGG	TACCTGCAGA	AGCCAGGCCA	GTCTCCAAAG	150
	160	170	180	190	200	
B3	AAACTGTTGA	TCTACTGGGC	ATCCACTAGG	GAATCTGGGG	TCCCTGATCG	200
E10	GCATCCTACC	GGTACAGTGG	AGTCCCTGAT	CGCTTCACAG	GCAGTGGATC	200
F11	GCATCCTACC	GGTACAGTGG	AGTCCCTGAT	CGCTTCACAG	GCAGTGGATC	200
H10	GCATCCTACC	GGTACAGTGG	AGTCCCTGAT	CGCTTCACAG	GCAGTGGATC	200
D10	CTCCTGATCT	ACAAAGTTTC	CAACCGATTT	TCTGGGGTCC	CAGACAGGTT	200
	CDR2					

	210	220	230	240	250	
B3	CTTCACAGGC	AGTGGATCTG	GAACAGATTT	CACTCTCACC	ATCAGCAGTG	250
E10	TGGGACAGAT	TTCACTCTCA	CCATCAGCAA	TGTGCAGTCT	GAAGACTTGG	250
F11	TGGGACAGAT	TTCACTCTCA	CCATCAGCAA	TGTGCAGTCT	GAAGACTTGG	250
H10	TGGGACAGAT	TTCACTCTCA	CCATCAGCAA	TGTGCAGTCT	GAAGACCTGG	250
D10	CAGTGGCAGT	GGATCAGGGA	CAGATTTTAC	ACTCAAGATC	AGCAGAGTGG	250

	260	270	280	290	300	
B3	TGCAGGCTGA	AGACCTGGCA	GTTTATTACT	GTCAGAATGA	TTATAGTTAT	300
E10	CAGAGTACCT	CTGTCAGCAA	TATAACAGCT	ATCCGTACAC	GTTCCGGAGGG	300
F11	CAGAGTATTT	CTGTCAGCAA	TATAGCAGCT	ATCCTCTCAC	GTTCCGGCTCG	300
H10	CAGAGTATTT	CTGTCAGCAA	TATAACAGCT	ATCCTCTCAC	GTTCCGGCTCG	300
D10	AGGCTGAGGA	TCTGGGAGTT	TATTTCTGCT	CTCAAAGTAC	ACATGTTCCG	300

CDR3

	310	320	330	340	
B3	CCATTCACGT	TCGGCTCGGG	GACAAAGTTG	GAAATAAAAC	GT 342
E10	GGGACCAATC	TGGAGCTGAA	ACGT		324
F11	GGGACAAAGT	TGGAAATANA	ACGT		324
H10	GGGACAAAGT	TGGAAATAAA	ACGT		324
D10	TGGACG	TTCG	GTGGAGGCAC	CAAGCTGGAA	ATCAAACGT 339

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtstag und -ort 02.02.1966 in Mannheim
Familienstand ledig

Schulbildung

1972-1976 Grundschule, Friedrich-Ebert-Schule, Ilvesheim
1976-1985 Carl-Benz-Gymnasium, Ladenburg
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1985-1988 Ausbildung zur Pharmazeutisch-Technischen-Assistentin(PTA)
Berufskolleg der Heinrich-Lanz-Schule, Mannheim,
Praktikum in der Rathaus Apotheke, Edingen

Berufstätigkeit

1988-1989 PTA in der Rathaus Apotheke, Edingen
1990-1991 PTA in der Hochstät Apotheke, Mannheim

Studium

1991-1997 Studium der Biologie
Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
Hauptfächer: Mikrobiologie und Botanik
Abschluß: Diplom-Biologin
1996-1997 Diplomarbeit
Humorale Immunantwort bei Onchozerkose
Hygiene-Institut der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

Promotionsarbeit

seit 1998 Thema: Analyse humoraler und zellulärer Mechanismen bei der
Xenotransplantatabstoßung im diskordanten
Kleintiermodell Meerschweinchen / Ratte
Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen
Hochschule Hannover

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich gemäß §5 (1) c) und d) der gemeinsamen Ordnung der naturwissenschaftlichen Fachbereiche für die Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) an der Universität Hannover in der Fassung vom 25.05.1994 an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, sowie dass diese Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Link C, Hawlisch H, Meyer zu Vilsendorf A, Gylerüz S, Nagel E and Köhl J. (1999) Selection of phage-displayed anti guinea pig C5 or C5a antibodies and their application in xenotransplantation. Mol. Immunol. 36:1253.

Meyer zu Vilsendorf A, Nagel E, Link C, Jörns A and Köhl J. (2000) Prolonged survival of guinea pig-to rat xenografts following complement depletion and B-cell-directed immunosuppression by malonitrylamide. Transplant. Proc. 35:864.

Meyer zu Vilsendorf A, Nagel E, Link C, Jörns A and Köhl J. (in press) Preconditioning with the prostacyclin analogue epoprostenol and cobra venom factor prevents reperfusion injury and hyperacute rejection in discordant liver xenotransplantation. Xenotransplantation.

Link C, Meyer zu Vilsendorf A and Köhl J. (in revision) Analysis of preformed xenoreactive antibodies in the discordant guinea pig to rat model using a guinea pig fibroblast-like cell line. Scand. J. Clin. Lab. Invest.

Meyer zu Vilsendorf A, Link C, Jörns A, Raschke U, Wyszomirski S, Nagel E and Köhl J. (submitted) Modulation of NK and B cell response in the discordant guinea pig to rat heart transplantation model. Xenotransplantation.

und als Kongressbeiträge präsentiert:

Link C, Hawlisch H, Gylerüz S and Köhl J. Recombinant antibodies against guinea pig C3a, C5a, and C5 from single chain Fv antibody variable domain libraries. 14. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 1998. Frankfurt, Germany.

Link C, Hawlisch H, Meyer zu Vilsendorf A, Gylerüz S, Nagel E and Köhl J. Selection and application of recombinant antibodies against guinea pig C5 and C5a to determine complement activation in xenotransplantation. 7th European Meeting on Complement in Human Disease, 1999, Helsinki, Finland.

Link C, Hawlisch H, Meyer zu Vilsendorf A, Gylerüz S, Nagel E and Köhl J. Selection and application of recombinant antibodies against guinea pig C5 and C5a to determine complement activation in xenotransplantation. 5th International Congress for Xenotransplantation, 1999, Nagoya, Japan.

Meyer zu Vilsendorf A, Link C, Jörns A and Köhl J. Prostacyclin analogue epoprostenol and cobra venom factor prevents reperfusion injury and hyperacute rejection in discordant liver transplantation. XVIIIth International Complement Workshop, 2000, Snowbird, Utah, U.S.A.

Link C and Köhl J. Macrophages and xenoreactive antibodies mediate delayed xenograft rejection in the discordant guinea pig to rat species combination. 2000. XVIIIth International Complement Workshop, 2000, Snowbird, Utah, U.S.A.