

Untersuchungen zur Xenoreaktivität menschlicher T-Lymphozyten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hartig, Carsten Volker
aus Mannheim-Neckarau

Gießen 2004

Aus dem Institut für Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am
Universitätsklinikum Giessen

Leiter: Prof. Dr. G. Bein

Gutachter: Prof. Dr. Bein

Gutachter: Frau Prof. Dr. Kemkes-Mathes

Tag der Disputation: 03.11.2004

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	4
2	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	5
3	EINLEITUNG.....	6
4	MATERIAL UND METHODEN	10
4.1	Isolierung und Reinigung menschlicher PBMC und menschlicher T-Lymphozyten.....	10
4.2	Isolierung und Reinigung der Mäuse-T-Lymphozyten.....	10
4.3	Bestimmung der MHC I und MHC II Phänotypen	11
4.4	Vorbereitung der Stimulatorzellen und der Antigen-präsentierenden Zellen (APCs)	11
4.5	ELISPOT Assay (human).....	11
4.6	ELISPOT Assay (murin).....	13
5	ERGEBNISSE.....	14
6	DISKUSSION	27
7	ABSTRACT	34
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	35
9	DANKSAGUNG	36
10	LEBENS LAUF	37
11	LITERATURVERZEICHNIS	39

2 Verwendete Abkürzungen

AVR:	Acute vascular rejection, akute vaskuläre Abstoßungsreaktion
APC:	Antigen presenting cell
CD:	Cluster of differentiation
DXR:	Delayed xenograft reception
ELISPOT:	Enzyme-linked immunospot
Gal:	Galaktose
HAR:	Hyperacute rejection, hyperakute Abstoßungsreaktion
IFN- γ :	Interferon- γ
Ig:	Immunoglobulin
IL:	Interleukin
MHC:	Major histocompatibility complex
PBMC:	Peripheral blood mononuclear cells
PBS:	Phosphate buffered saline
PERV:	Porcine endogenous retrovirus
PHA:	Phytohemagglutinin
SLA:	Swine leukocyte antigen, MHC-Komplex des Schweins

3 Einleitung

Die begrenzte Anzahl menschlicher Organe, die für eine Transplantation zur Verfügung stehen, hat ein großes klinisches Interesse an der Verwendung von Xenotransplantaten verursacht. In diesem Zusammenhang werden die Organe von Hausschweinen als möglicherweise sehr nützlich angesehen (Übersichtsarbeiten dazu in ^{1,2}). Weil die durch immunologische Mechanismen verursachte Abstoßung des Transplantats einer der Hauptgründe ist, der von einem breiten Einsatz der Xenotransplantation abhält ^{1,3,4}, ist es essentiell, die menschliche Immunantwort gegen Schweineorgane bzw. Zellen zu untersuchen und zu verstehen.

Zusätzlich zu den immunologischen Barrieren, die die Xenotransplantation bis jetzt verhindern, gibt es auch nicht-immunologische Hindernisse für eine erfolgreiche Xenotransplantation. Die unterschiedliche Physiologie des Schweins wirft insbesondere im Hinblick auf den Stoffwechsel der zu transplantierenden Organe Fragen auf ⁵. Auch die geringere Lebensdauer der Schweine im Vergleich zu uns birgt Probleme in Bezug auf das Langzeittransplantatüberleben.

Ein weiterer kontrovers diskutierter Punkt bei allen Überlegungen um den zukünftigen Einsatz von Xenotransplantaten ist die Infektionsgefahr durch Zoonosen. Insbesondere geht es dabei um die Gefahr, die von in das Schweinegenom integrierte Retroviren (PERV) ausgeht.

Es ist nachgewiesen worden, dass in Zellkulturen menschliche Zellen durch PERVs infiziert werden können ^{6,7,8}. Die Signifikanz dieser Entdeckung und die Auswirkungen auf die weitere Forschung sowie auf bereits angelaufene und geplante Studien sind umstritten ^{9,10,11,12,13,14}. Man kann PERVs nicht durch Zucht aus dem Schweinegenom entfernen, da mindestens 50 Kopien an verschiedenen Stellen im Schweinegenom vorhanden sind. Bis jetzt ist bei den rund 160 Personen, die im Rahmen von klinischen Studien lebenden Schweinezellen ausgesetzt waren, kein Fall einer PERV-Infektion aufgetreten.

Diejenigen Viren (und andere Krankheitserreger), die von Tier zu Tier weitergegeben werden, kann man durch Selektion gesunder Tiere mit Hilfe von Isolierung und Langzeitbeobachtung größtenteils von der Weitergabe an Menschen ausschließen. Allerdings besteht vor allem durch die notwendige Langzeitimmunsuppression nach Xenotransplantation die Gefahr, dass mitübertragene Pathogene die Immunsuppression des neuen Wirtes zur Adaption an die menschliche Physiologie und das menschliche Immunsystem ausnutzen könnten. Solcherart veränderte Erreger könnten einen Wirtswechsel von bisher nicht humanpathogenen Erregern ermöglichen. Hinzu kommt die Tatsache, dass sowohl HIV-1 als auch HIV-2 mit hoher

Wahrscheinlichkeit Zoonosen sind; das Gefährdungspotential neuer Zoonosen sollte also keinesfalls vernachlässigt werden.

Neue Studien über die humoralen und zellulären Mediatoren der menschlichen anti-Schwein-Immunantwort führen uns zu neuen Erkenntnissen über die Mechanismen der Abstoßung von Xenotransplantaten.

Die Abstoßung eines Xenotransplantats beginnt mit der hyperakuten Abstoßung (HAR). Hierbei erfolgt eine Zerstörung des Transplantats innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden durch eine prä-existierende humorale Immunität.

Es ist anerkannte Tatsache, dass Menschen (und Primaten) natürlicherweise hohe Titer von xenospezifischen Antikörpern entwickeln, die gegen endotheliale Antigene von Schweinen gerichtet sind^{15,16}. Diese Antikörper sind gegen ein dominantes Gal (α 1,3) Gal Epitop¹⁷ gerichtet. Sie nehmen mehr als 2 Prozent der gesamten zirkulierenden IgM und IgG Antikörper ein.

Die HAR entsteht durch das Zusammenwirken dieser xenoreaktiven anti- α -Gal Antikörper mit dem Komplementsystem. Im Verlauf der Immunreaktion kommt es zu einem Funktionsverlust der endothelialen Zellen des Transplantats, deren Oberflächenantigene den anti- α -Gal Antikörpern als Ziel dienen. Durch diesen Funktionsverlust der endothelialen Zellen entsteht ein interstitielles Ödem, es kommt zu einem Blutaustritt ins Interstitium mit der Folge der Aktivierung der Gerinnungskaskade durch den Kontakt mit der extrazellulären Matrix.

Kombinationen von Spender- und Empfängerspezies, bei denen es normalerweise zu HAR kommt, nennt man diskordant, Kombinationen, bei denen das selten der Fall ist, konkordant.

Mehrere Arbeitsgruppen haben große Anstrengungen darangesetzt, diese natürliche humorale Immunität zu bewältigen und/oder zu umgehen; aus diesen Anstrengungen rühren mehrere vielversprechende Ansätze her, die zur Zeit untersucht werden^{1,18,19,20,21,22,23,24}.

Um die durch Antikörper gegen den terminalen Gal (α 1,3) Gal Zuckerrest verursachte HAR zu unterbinden, werden verschiedene Strategien entwickelt:

1. Die Immunadsorption von menschlichem Plasma, um anti- α -Gal Antikörper zu entfernen; die Antikörperspiegel normalisieren sich danach sehr schnell wieder
2. Die Inhibition der Komplementkaskade mit Anti-Komplement-Antikörpern oder löslichem Komplementrezeptor

3. Das Schaffen transgener Schweine, die Fucosyltransferase im Übermaß exprimieren. Dadurch wird die α -Gal-Gruppe durch eine Fucose-Gruppe, die ein natürliches Blutgruppenantigen bei Menschen darstellt, ersetzt.
4. Das Schaffen transgener Schweine, die menschliche Komplement-regulierende Proteine exprimieren, z.B. CD55 = DAF, CD46 = MCP-1, CD59 = protectin. Sie verhindern nicht die Bindung an α -Gal, sondern blockieren spätere Schritte der Komplementkaskade.
5. Das Schaffen von *knock-out* Schweinen ohne das Gen, welches für α 1,3-Galactosyltransferase kodiert.

Wenn die HAR unterdrückt wird, folgt als nächster Schritt der Immunantwort die akute vasculäre Abstoßung (AVR). Bei der AVR, die auch verzögerte Xenotransplantatabstoßung (DXR) genannt wird, handelt es sich um eine durch Antikörper und Aktivierung von Endothelzellen vermittelte Abstoßungsreaktion.

In manchen Fällen kommt es nach der Unterdrückung der HAR durch Depletion von Antikörpern und Komplement nicht zur AVR, sondern einer fortdauernden Transplantatfunktion. Dies nennt man Akkomodation. Dafür werden verschiedene Ursachen diskutiert: Zum einen könnte dies an einer Veränderung der xenoreaktiven Antikörper liegen, entweder in ihren funktionellen Eigenschaften oder ihrer Spezifität. Ein Beispiel dafür ist das Vorherrschen von IgG2, welche Komplement schlechter aktivieren als andere IgG-Subtypen. Zum zweiten verändert sich möglicherweise das Antigen oder das Endothel im ganzen.

Zusätzlich zu der humoralen menschlichen anti-Schwein Immunantwort sind T-Lymphozyten in der Lage, eine akute Form der Xenotransplantatabstoßung hervorzurufen. Es ist wahrscheinlich, dass die T-Zell-Immunantwort das nächste große Hindernis auf dem Weg zu einer effektiven Xenotransplantation sein wird, sobald das Problem der durch Xenoantikörper verursachten hyperakuten Abstoßung überwunden ist^{25,26,27,28,29}. Es erscheint möglich, dass sich analog zu der natürlichen humoralen Immunität eine menschliche Gedächtnis-T-Lymphozytenantwort gegen Schweineantigene entwickelt. Ein solcher Mechanismus könnte bedeutsame Auswirkungen auf das Überleben von Xenotransplantaten haben.

Die von der Arbeitsgruppe Heeger et al. vor kurzem durchgeführte Untersuchung (mit Hilfe eines hochsensiblen ELISPOT-Assays) an den Empfängern von Nierenallotransplantaten hat ergeben, dass diejenigen Transplantatempfänger, die schon vor der Transplantation eine hohe Anzahl an spender-spezifischen IFN- γ produzierenden Gedächtnis-Zellen besaßen, ein hohes

Risiko für akute Abstoßungsepisoden haben³⁰. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Hypothese, dass eine vorbestehende Gedächtnis-T-Zell-Immunität das Überleben des Transplantats negativ beeinflussen kann.

Ich habe in dieser Arbeit dieselbe Vorgehensweise benutzt, um festzustellen, ob bei menschlichen T-Lymphozyten aus peripherem Blut eine xenogene Gedächtnisantwort in vitro induziert werden kann, auch ohne dass eine abgelaufene Sensibilisierung bekannt ist.

4 Material und Methoden

4.1 Isolierung und Reinigung menschlicher PBMC und menschlicher T-Lymphozyten

Blutproben wurden von 14 erwachsenen Freiwilligen ohne spezielle diätetische Nahrungseinschränkungen und im Rahmen der Vorbereitung und Nachsorge von 42 Patienten, bei denen an den *University Hospitals of Cleveland* Nierentransplantationen durchgeführt wurden, gewonnen. Zusätzlich erhielt ich Blutproben von 14 Erwachsenen, die aus religiösen Gründen noch nie Schweinefleisch zu sich genommen haben (4 orthodoxe Juden, 8 Muslime und 2 Hindus). Außerdem erhielt ich Blutproben von 4 Kindern im Alter zwischen 6 und 24 Monaten. Nabelschnurblut wurde von 17 Patienten nach normaler vaginaler Geburt gewonnen.

Mononukleäre Zellen wurden aus 5-20 ml Blut durch *Standard Isoprep* (*Robbins Scientific, Sunnyvale, CA*) Zentrifugation gewonnen. Lebende Zellen wurden unter einem Immunfluoreszenzmikroskop nach Beigabe von Acridin Orange/Ethidiumbromid gezählt. In einigen Experimenten wurden die T-Lymphozyten zu einem Reinheitsgrad $>92\%$ CD3⁺ Zellen mit Hilfe von im Handel verfügbaren T-Zell Isolierungssäulen (*R&D Systems, Minneapolis, MN*) angereichert.

Alle Studien wurden im Einklang mit den von den Ethikkommissionen an den *University Hospitals of Cleveland* und dem *Cleveland Veterans Affairs Medical Center* verabschiedeten Richtlinien durchgeführt.

4.2 Isolierung und Reinigung der Mäuse-T-Lymphozyten

C57BL/6 Mäuse (*H-2^b*) wurden von *The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME)* bezogen und in den pathogen-freien Tierställen im *Cleveland Veterans Affairs Medical Center* im Einklang mit den Tierhaltungsrichtlinien gehalten.

Die Immunisierung mit Schweinezellen erfolgte als intraperitoneale Injektion von 5 Millionen Schweinezellen in 200 µl Kochsalzlösung nach einer Behandlung mit Mitomycin C (*Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN*) (50 µg/ml für 30 min, danach 3 Waschungen mit Hank's Balanced Salt Solution³⁰).

2 Wochen nach Immunisierung wurden die Mäuse durch CO₂-Asphyxie getötet und die Milzen entnommen. T-Lymphozyten wurden zu einem Reinheitsgrad $>92\%$ CD3⁺ Zellen mit Hilfe von im Handel verfügbaren T-Zell Isolierungssäulen (*R&D Systems, Minneapolis, MN*) angereichert.

4.3 Bestimmung der MHC I und MHC II Phänotypen

HLA Phänotypen wurden mit Hilfe von klinischen Standard-Typisierungstechniken bestimmt³⁰. Die von HLA Klasse I Loci (A, B und C) kodierten Antigene wurden durch den Mikrolymphozytotoxizitätsassay gemäß NIH-Standard³¹ identifiziert, wobei lokal vorhandene Antiseren verwendet wurden.

Zellen, deren HLA Klasse I Antigene typisiert werden sollten, wurden mit Antiseren bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und dann unter der Zugabe von Komplement für weitere 60 Minuten bei 20°C inkubiert. Das Ergebnis wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit Acridin Orange und Ethidiumbromid beurteilt. Auf die Anwesenheit von Antigenen, die durch die bereits erwähnten Antiseren erkannt wurden, konnte man durch den Zelltod in den betreffenden Vertiefungen schließen.

Klasse II Allele wurden durch Sequenz-spezifisches *Priming* und Polymerasekettenreaktion bestimmt³², wobei ein Puregene DNA Isolierungskit (*Genra Systems, Minneapolis, MN*) und Primersets (*One Lambda, Canoga Park, CA*), die spezifisch für ein oder einige wenige Allele sind, verwendet wurden. Um die Segmente der korrespondierenden Gene zu amplifizieren, wurde ein *Gene Amp 9600 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT)* verwendet. Die amplifizierten Produkte wurden dann in 2% Agarose-Gel durch Elektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Aus den resultierenden Bandenmustern wurden anschließend die DR und DQ Allele bestimmt.

4.4 Vorbereitung der Stimulatorzellen und der Antigen-präsentierenden Zellen (APCs)

Aus Blutproben von Inzuchtschweinen aus den Stämmen SLA^{aa}, SLA^{cc} und SLA^{dd} wurden durch Isoprepzentrifugation Lymphozyten gewonnen. In manchen Experimenten wurden Schweinezellen, menschliche Zellen oder Mäusezellen einer Behandlung mit Mitomycin C (*Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN*) unterworfen (50 µg/ml für 30 min, danach 3 Waschungen mit Hank's Balanced Salt Solution³⁰).

4.5 ELISPOT Assay (human)

96 well ELISPOT Platten (*Cellular Technologies, Cleveland, OH*) wurden mit *capture*-Antikörpern in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) beschichtet und bei 4°C für 12 h bis 18 h aufbewahrt: Interferon-γ (2G1, *Endogen, Woburn, MA*; 4 µg/ml), Interleukin-2 (5334.21, *R&D Systems, Minneapolis, MN*; 6 µg/ml), Interleukin-4 (8D4-8, *Pharmingen, San Diego, CA*; 2 µg/ml) und Interleukin-5 (TRFK5, von einem Hybridom aus dem Labor der Arbeitsgruppe Heeger et al. isoliert; 5 µg/ml). Die Platten wurden anschließend für 1 h mit PBS und

1,0% bovinem Serumalbumin (BSA) geblockt und danach dreimal mit PBS gewaschen. 300.000 der zu untersuchenden Lymphozyten aus peripherem Blut wurden dann in jede Vertiefung in 100 µl komplettem RPMI Medium gegeben³⁰. Fötale Rinderserum stammte von *HyClone (Logan, UT)*. Nach Zugabe der Lymphozyten oder gereinigten T-Lymphozyten in die ELISPOT Vertiefungen wurden sie *in vitro* durch die Zugabe von Schweinestimulatorlymphozyten, *sonicates* dieser Schweinestimulatorlymphozyten, syngenen oder allogenen menschlichen PBMC, oder PHA (10 µg/ml Endkonzentration, *Sigma, St. Louis, MO*) in einem Endvolumen von 200 µl aktiviert. Bei den *sonicates* handelt es sich um ein Zelllysat aus Schweinezellen, hergestellt durch das Ultraschallzerkleinern von 2×10^7 Schweinezellen in 1 ml RPMI mit 10 eine Sekunde langen Pulsen eines *Fisher Scientific Cell Sonicators (Pittsburgh, PA)*, gefolgt von Einfrieren und wieder Auftauen. Kontroll-Vertiefungen enthielten zu testende PBMC oder Stimulatorzellen jeweils nur mit Mediumzugabe. In einigen Experimenten wurden 3×10^6 PBMC *in vitro* durch Zugabe von 3×10^6 Mitomycin C behandelten Schweinezellen in 2 ml RPMI Lösung + 10% fötalem Kälberserum für 5-6 Tage in Kultur primär stimuliert, und wurden dann in sekundären Assays durch Zugabe zu ELISPOT Platten getestet. Nach 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ für IFN-γ und IL-2 bzw. 48 Stunden für IL-4 und IL-5 wurden die Platten gewaschen, danach wurden biotinylierte Detektionsantikörper zugegeben (IFN-γ: B133.5, *Endogen*, 1,0 µg/ml; IL-2: BG5, *Endogen*, 0,5 µg/ml; IL-4: MP4-25D2, *Pharmingen*, 2 µg/ml; IL-5: JES1-5A10, *Pharmingen*, 2 µg/ml). Anschließend wurden die Platten bei 4°C für 12 h bis 18 h aufbewahrt. Im nächsten Schritt wurde Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (*Dako, Carpinteria, CA*) für 2 Stunden bei Raumtemperatur zugegeben. Die *spots* wurden mit Hilfe von 1 ml AEC (*Pierce Pharmaceuticals, Rockford, IL*; 10 mg/ml in N,N Dimethylformamid), das in 30 ml 0,1 M Natriumacetat (pH 5,0) verdünnt und anschließend gefiltert und mit 15 µl H₂O₂ gemischt wurde, entwickelt. Von der entstehenden Lösung wurden pro Vertiefung 200 µl verwendet. Die entstandenen *spots* wurden mit Hilfe eines computerunterstützten *Immunospot Image Analyzers (Cellular Technology, Cleveland, OH)* gezählt³⁰.

Die digitalisierten Bilder werden dabei auf Bereiche analysiert, in denen die Farbdichte des Hintergrunds um einen bestimmten Faktor überschritten wird, der durch den Vergleich von Negativkontroll-Vertiefungen und positiven (Experimental) Vertiefungen gebildet wird. Nach der Trennung von *spots*, die sich berühren oder teilweise überlappen, werden zusätzliche Kriterien der *spot*-Größe und Form benutzt, um akzidentelle Färbungen der Vertiefung durch Präzipitation des Substrats und unspezifische Antikörperbindung auszuschließen. Die ge-

färbten Bereiche, die alle Bedingungen erfüllen, werden als *spots* erkannt, als solche für den Benutzer sichtbar markiert und gezählt.

4.6 ELISPOT Assay (*murin*)

96 *well* ELISPOT Platten (*Cellular Technologies, Cleveland, OH*) wurden mit *capture*-Antikörpern in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) beschichtet und bei 4°C für 12 h bis 18 h aufbewahrt: IFN- γ (R46A2, von einem Hybridom aus der Arbeitsgruppe von Heeger et al. isoliert; 4 $\mu\text{g/ml}$).

Die Platten wurden dann für 1 h mit PBS und 1,0% bovines Serumalbumin (BSA) geblockt und danach dreimal mit PBS gewaschen.

Nach Zugabe der gereinigten T-Lymphozyten in die ELISPOT Vertiefungen wurden sie *in vitro* durch die Zugabe von Zelllysat der Schweinestimulatorlymphozyten und syngenen APCs von naiven C57BL/6 Mäusen oder PHA (10 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration, *Sigma, St. Louis, MO*) in einem Endvolumen von 200 μl aktiviert. Kontrollvertiefungen enthielten T-Lymphozyten nur mit Mediumzugabe oder Zelllysat.

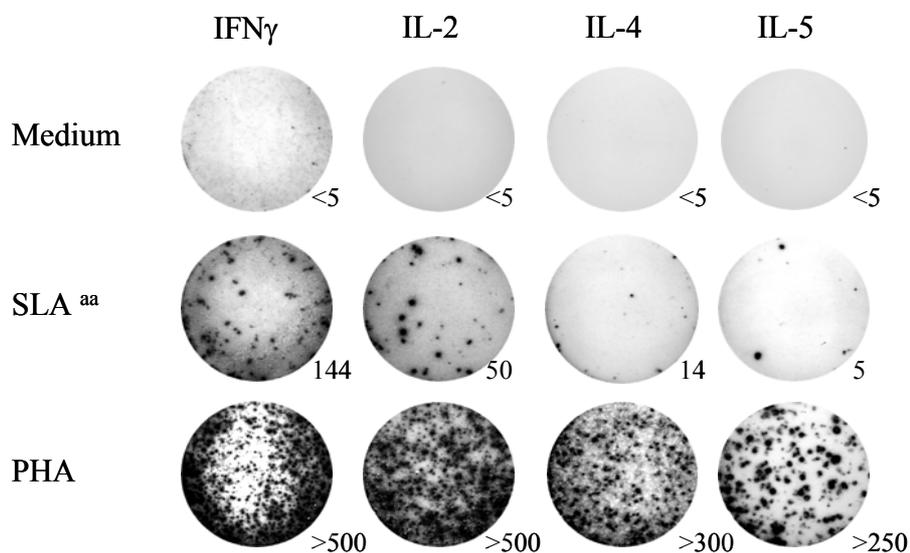
Nach Kultivierung für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Platten gewaschen, biotinylierte Detektionsantikörper wurden zugegeben, anschließend wurden die Platten bei 4°C für 12 h bis 18 h aufbewahrt (IFN- γ : XMG1.2 biotin 2 $\mu\text{g/ml}$, *Pharmingen*). Nach erneutem Waschen wurde Streptavidin-Alkalin-Phosphatase für 2 h hinzugefügt. Die *spots* wurden dann mit NBT/BCIP Substrat (*Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD*) entwickelt.

Die entstandenen *spots* wurden mit Hilfe eines computerunterstützten *Immunospot Image Analysers* (*Cellular Technology, Cleveland, OH*) gezählt (s.o.).

5 Ergebnisse

Ich begann mit der Untersuchung von *in vitro* durch Schweinezellen stimulierten PBMC von Erwachsenen ohne diätetische Einschränkungen. Hierbei erfasste ich die Frequenz und das Profil der ausgeschütteten Zytokine, wozu ich einen ELISPOT Assay einsetzte. Mit Hilfe dieser Untersuchungsmethode konnte ich Zytokinproduktion innerhalb von 24 h bis 48 h nach Stimulation *in vitro* messen, was eine zu kurze Zeitspanne ist, um T-Zell-Proliferation und Differenzierung zuzulassen. Die Arbeitsgruppe von Heeger et al. hat gezeigt, dass dieser Assay eine Einzellauflösung besitzt, und dass die Produktion von IFN- γ , IL-4 und IL-5 in diesem Intervall der Zytokinproduktion von Gedächtnis-Zellen entspricht³⁰. Humane PBMC wurden auf ihre Zytokinproduktion als Antwort auf Stimulation durch PBMC von SLA^{aa}, SLA^{cc} und SLA^{dd} Minischweinen untersucht. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass die für den humanen ELISPOT verwendeten Antikörper nicht mit den Schweinezytokinen kreuzreagierten (*diese Daten werden hier nicht gezeigt*), so dass alle gemessenen Antworten von den humanen Zellen ausgehen. Repräsentative ELISPOT Vertiefungen, die in Abbildung 1 dargestellt sind, zeigen praktisch keine Antwort von unstimulierten humanen PBMC.

Abbildung 1



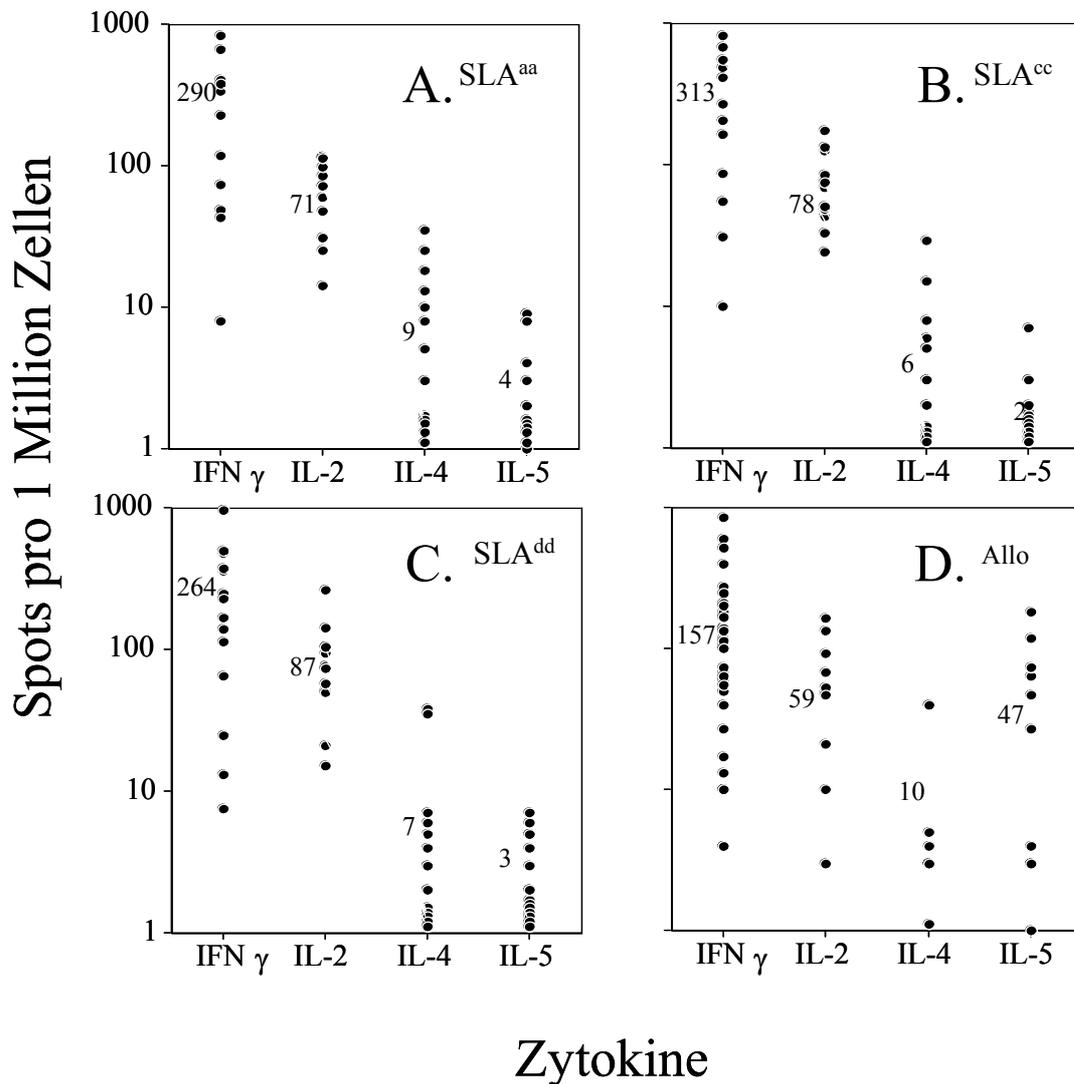
Nachweis humaner anti-Schwein Immunität durch ELISPOT. Repräsentative IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-5 ELISPOT Vertiefungen mit jeweils 300.000 menschlichen PBMC. Erste Reihe nur mit Medium, zweite Reihe mit 300.000 Schweinestimulatorzellen, dritte Reihe mit PHA (10 μ g/ml). Schweinestimulatorzellen alleine und mit PHA produzierten keine messbaren Zytokine (*diese Daten werden hier nicht gezeigt*)

Im Gegensatz dazu sind klare *spots* sichtbar, die die Zytokinausschüttung einzelner Zellen zeigen, wenn die PBMC mit Schweinestimulatorzellen inkubiert wurden. Wie man sehen kann, wird die Antwort von IFN- γ und IL-2 produzierenden Zellen dominiert, einige IL-4 und IL-5 produzierende Zellen werden jedoch ebenfalls gemessen. Mitogenstimulation mit PHA diente als positive Kontrolle und induzierte die Produktion aller getesteten Zytokine.

Die Häufigkeiten und Zytokinprofile schweinespezifischer PBMC einer Gruppe von 14 erwachsenen Versuchspersonen (ohne diätetische Einschränkungen) sind in Abbildung 2A-C dargestellt. Das Zytokinprofil der schweinespezifischen PBMC wurde bei allen drei getesteten Haplotypen (SLA^{aa}, SLA^{cc} und SLA^{dd}) von IFN- γ und IL-2 Produzenten deutlich dominiert. Die Häufigkeit der schweinespezifischen IFN- γ produzierenden Zellen lag im Bereich von 10-850/eine Million Zellen (d.h. zwischen 1/100.000 und 1/1.200), wobei die Mittelwerte zwischen 264 und 313/eine Million Zellen lagen. Diese Ergebnisse entsprechen einer starken Gedächtnis-Antwort auf Schweineantigene in mehr als 90% der getesteten Versuchspersonen. PBMC von weniger als 10% (1/14) der getesteten Blutproben produzierten keine schweinespezifischen IFN- γ ELISPOTs, obwohl die Positivkontrolle durch PHA-Stimulation zeigen konnte, dass diese Zellen in der Lage waren, IFN- γ zu produzieren.

Die Resultate analoger Versuche zur Alloreaktivität werden in Abbildung 2D zum Vergleich gezeigt. Es handelt sich um die Ergebnisse einer Gruppe von Erwachsenen, die in Vorbereitung einer Nierentransplantation voruntersucht wurden. PBMC wurden mit allogenen Stimulatorzellen getestet, die an 5 oder 6 der 6 Loci A, B und DR ein *mismatch* aufwiesen (alle diese Patienten hatten einen *panel reactive antibody* Wert von unter 5%). Vergleichbar mit der Antwort auf Xenostimulation und im Einklang mit früheren Studien von Heeger et al.³⁰, produzierten die alloreaktiven PBMC hauptsächlich IFN- γ und IL-2, aber zusätzlich geringe Mengen IL-5. Der Mittelwert der gemessenen Häufigkeiten lag bei 157/eine Million Zellen (das Spektrum reichte von <5 bis 850); das war weniger als bei den xenoreaktiven Zellen, allerdings bestand eine deutliche Überlappung zwischen den beiden Gruppen. Insgesamt zeigen die Daten, dass eine sich natürlich entwickelnde zelluläre Immunantwort auf Schweineantigene beim erwachsenen Menschen existiert, und dass die Frequenz dieser xenoreaktiven PBMC etwa zweimal so hoch ist wie die von alloreaktiven.

Abbildung 2



Häufigkeit und Zytokinprofile schweinespezifischer PBMC und alloreaktiver PBMC von Erwachsenen. PBMC von 14 erwachsenen Versuchspersonen ohne diätetische Einschränkungen wurden in Zytokin ELISPOT Assays auf ihre Reaktivität gegen Stimulatorzellen von Inzuchtschweinen des Haplotyps SLA^{aa} (Kasten A), SLA^{cc} (Kasten B) und SLA^{dd} (Kasten C) getestet. Kasten D zeigt die Ergebnisse von Zytokin ELISPOT Assays von 42 Individuen, die gegen allogene Stimulatorzellen getestet wurden, die an 5 oder 6 der Loci A, B und DR unterschiedliche Allele besaßen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von zwei Vertiefungen des selben Individuums dar ($< 10\%$ Variabilität zwischen den einzelnen Vertiefungen). Die Zahl neben jedem Satz an Datenpunkten ist der Mittelwert pro eine Million Zellen für alle getesteten Individuen. PHA-Stimulation ergab > 200 spots pro Vertiefung für jedes Zytokin (nicht dargestellt).

In vitro Vorstimulation humaner PBMC bewirkte eine deutliche Erhöhung der Häufigkeit xenoreaktiver zytokinproduzierender Zellen in einem Restimulations-Assay (Tabelle I, Abbildung 3), bis zu dem 30fachen der Antwort ohne vorherige Kultur mit Antigen (naive Antwort). Obwohl diese Antwort von $IFN-\gamma$ produzierenden Zellen weiterhin dominiert war,

waren ebenfalls deutliche Zahlen von IL-4 und IL-5 produzierenden Zellen messbar. Vorstimulation mit allogenen Zellen eines nicht verwandten, in seinen HLA Eigenschaften komplett differenten Individuums, ergab zwar ebenso eine deutliche Erhöhung der Anzahl der zytokinproduzierenden Zellen im Vergleich zu der Antwort ohne vorherige Kultur mit Antigen (naive Antwort), aber die Häufigkeit der alloreaktiven Zellen nach Vorstimulation blieb durchgehend niedriger als die der xenoreaktiven Zellen nach Vorstimulation (Tabelle I).

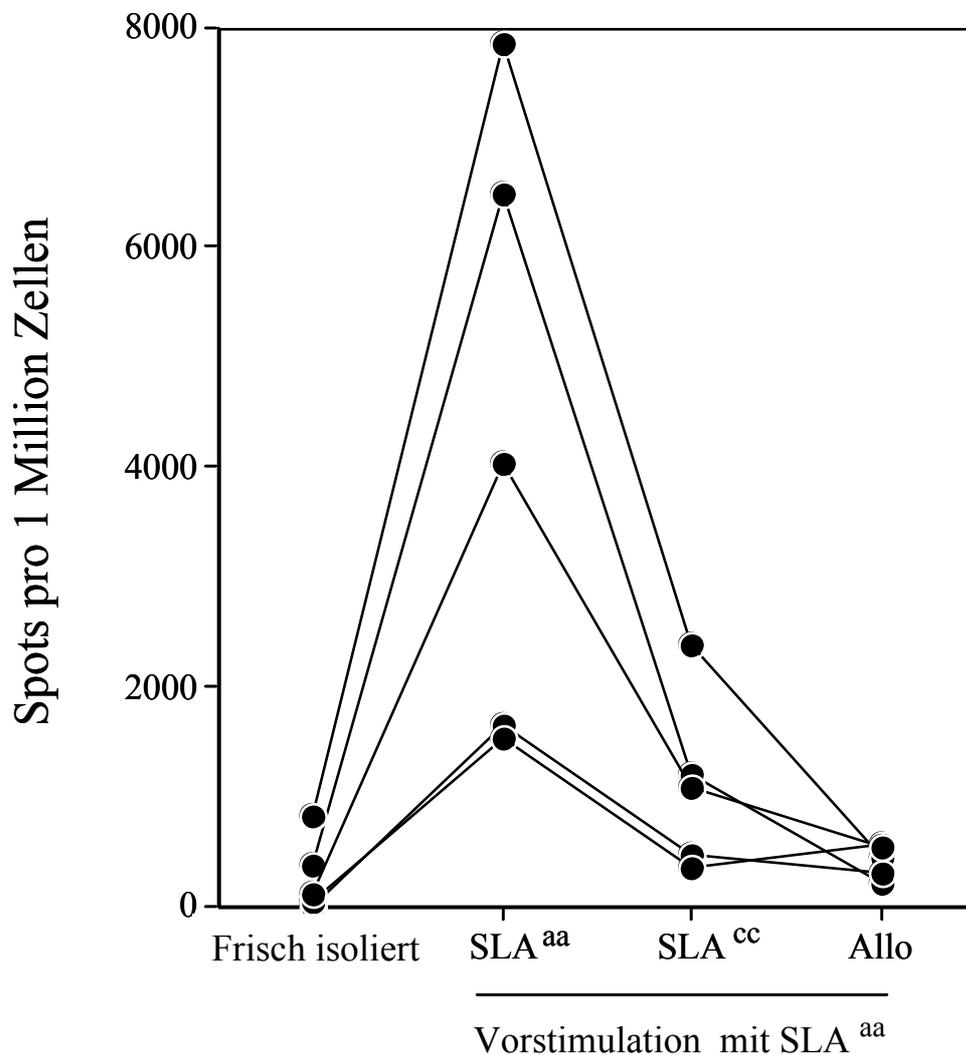
Tabelle I

Vergleich von Allo- und Xenoreaktivität menschlicher PBMC vor und nach *in vitro* Stimulation

Freiwilliger	PBMCs	Stimulatorzellen	Restimulations ELISPOTs (Spots/1 Million Zellen)			
			IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-5
1	Frisch isoliert	SLA ^{dd}	232	85	32	<5
1	Nach Stimulation	SLA ^{dd}	1793	628	40	48
1	Frisch isoliert	Allo (1 vs 2)	83	18	13	7
1	Nach Stimulation	Allo (1 vs 2)	815	108	60	8
2	Frisch isoliert	SLA ^{dd}	165	52	<5	<5
2	Nach Stimulation	SLA ^{dd}	4955	1245	23	18
2	Frisch isoliert	Allo (2 vs 1)	98	32	8	<5
2	Nach Stimulation	Allo (2 vs 1)	2390	18	8	<5

Frisch isolierte PBMC von zwei erwachsenen Freiwilligen wurden entweder direkt in Zytokin ELISPOT Assays getestet oder in vitro für 6 Tage mit Mitomycin C behandelten Stimulatorzellen inkubiert und dann in spezifischen Restimulations ELISPOT Assays getestet. Bei den Stimulatorzellen handelte es sich entweder um xenogene PBMC von Inzuchtschweinen (SLA^{dd}) oder um komplett HLA-differente menschliche PBMC (Allo). Die HLA-Allele von Versuchsperson 1 sind A2,28 B13,14 DR1,7 und die von Versuchsperson 2 A1,23 B8,44 DR17,52. Die Spot-Häufigkeiten repräsentieren den Mittelwert von zwei Vertiefungen eines Individuums, ausgezählt mit computerunterstützter Bildanalyse. Es gab < 10 % Variabilität zwischen den einzelnen Vertiefungen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei verschiedene Experimente.

Abbildung 3



Häufigkeit und Spezifität von *in vitro* stimulierter humaner anti-Schwein zellulärer Immunität. Frisch isolierte PBMC von 5 der Freiwilligen ohne diätetische Einschränkungen wurden entweder sofort in IFN- γ ELISPOT Assays mit SLA^{aa} Stimulatorzellen getestet oder *in vitro* mit SLA^{aa} Stimulatorzellen für 6 Tage stimuliert und dann in Restimulations-Assays gegen SLA^{aa} Stimulatorzellen, SLA^{cc} Stimulatorzellen und allogene Stimulatorzellen (als Spezifitätskontrolle) getestet. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von zwei Vertiefungen eines Individuums (< 10 % Variabilität zwischen den einzelnen Vertiefungen). Die durchgezogenen Linien verbinden die Ergebnisse der spezifischen und der Kontrollantworten der einzelnen Individuen.

Im Einklang mit anderen bereits veröffentlichten Studien, bei denen schweinespezifische CD4⁺ T-Zelllinien verwendet wurden²⁶, ergab sich, dass die Vorstimulation mit SLA^{aa} und SLA^{dd} Stimulatorzellen eine starke Antwort bewirkte, die zu einem großen Teil kreuzreaktiv zueinander war (Tabelle II). Vorstimulation mit SLA^{dd} ergab eine Restimulations-Reaktivität

gegen SLA^{dd} und Kreuzreaktivität gegenüber SLA^{aa}, mit nur geringer Kreuzreaktivität gegen SLA^{cc}. Vorstimulation mit SLA^{aa} ergab eine Restimulations-Reaktivität gegen SLA^{aa} und Kreuzreaktivität gegenüber SLA^{dd} und SLA^{cc}, wobei die Antwort auf SLA^{dd} jedoch signifikant stärker (ungefähr zweimal so hoch) war als die gegen SLA^{cc} ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu ergab die Vorstimulation mit SLA^{cc} eine spezifische Immunität auf SLA^{cc}, mit einer relativ geringen Kreuzreaktivität gegen SLA^{aa} und SLA^{dd} (Tabelle II). Hinzu kommt, dass nach *in vitro* Vorstimulation mit SLA^{aa} Stimulatorzellen eine xenospezifische Immunantwort resultierte, bei der 10 bis 30fach weniger Zellen auf eine Kontrolle mit allogenen Stimulatorzellen reagierten (Abbildung 3), was ein weiterer Hinweis auf die Spezifität dieser Antwort ist.

Tabelle II

Spezifität xenoreaktiver PBMC nach *in vitro* Vorstimulation

Stimulatorzellen für die erste Stimulation	Restimulations IFN- γ ELISPOTs (Spots/1 Million Zellen)		
	SLA ^{aa}	SLA ^{cc}	SLA ^{dd}
frisch isoliert (keine erste Stimulation)	73	31	140
SLA ^{aa}	4223	1067	1863
SLA ^{cc}	770	3133	400
SLA ^{dd}	717	210	997

Frisch isolierte PBMC einer erwachsenen Versuchsperson wurden entweder direkt in IFN- γ ELISPOT Assays gegen Schweinestimulatorzellen getestet (frisch isoliert) oder wurden für 5 Tage in vitro mit entweder SLA^{aa}, SLA^{cc} oder SLA^{dd} Schweinestimulatorzellen stimuliert und dann in Restimulations-IFN- γ ELISPOT Assays gegen alle drei Haplotypen getestet. Die Spot-Häufigkeiten repräsentieren den Mittelwert von zwei Vertiefungen eines Individuums, ausgezählt mit computerunterstützter Bildanalyse. Es gab < 10 % Variabilität zwischen den einzelnen Vertiefungen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei verschiedene Experimente, die mit zwei verschiedenen Versuchspersonen durchgeführt wurden.

Um zu bestätigen, dass die gemessenen Zytokine von xenoreaktiven T-Lymphozyten produziert werden, und um zu bestimmen, ob diese Antwort einer direkten oder indirekten Erkennung der Schweineantigene entspricht, isolierte ich gereinigte T-Lymphozyten aus den PBMC. Diese gereinigten T-Zellen testete ich dann zusammen mit Schweinestimulatorzellen, um die direkte Xenoreaktivität zu messen. Um die indirekte Xenoreaktivität zu messen, wurden die gereinigten T-Zellen mit Mitomycin C behandelten syngenen PBMC (als Quelle von antigen-präsentierenden Zellen) und einem *Sonicate* (einer Lösung/Suspension aus ultra-

schallzerkleinerten Zellbestandteilen als Quelle von immunreaktiven Peptiden) aus Schweinezellen stimuliert (analog zu den von Heeger et al. bereits veröffentlichten Studien über murine indirekte Alloreaktivität³³).

Wie in Abbildung 4 gezeigt, war die Häufigkeit der gemessenen zytokinproduzierenden Zellen signifikant höher bei Verwendung von T-Lymphozyten (>92% CD3⁺ Durchflußzytometrie) als bei der Verwendung von unfraktionierten PBMC (35-40% CD3⁺ Durchflußzytometrie). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Anreicherung einer zytokinproduzierenden T-Zellpopulation. Die T-Zellen schütteten keine Zytokine als Antwort auf syngene Stimulatorzellen ± Schweinezelllysate bzw. auf Schweinezelllysate alleine aus, was vermuten lässt, dass die indirekte Reaktivität nicht wesentlich zu dieser sich natürlich entwickelnden zellulären Immunantwort gegen Schweineantigene beiträgt.

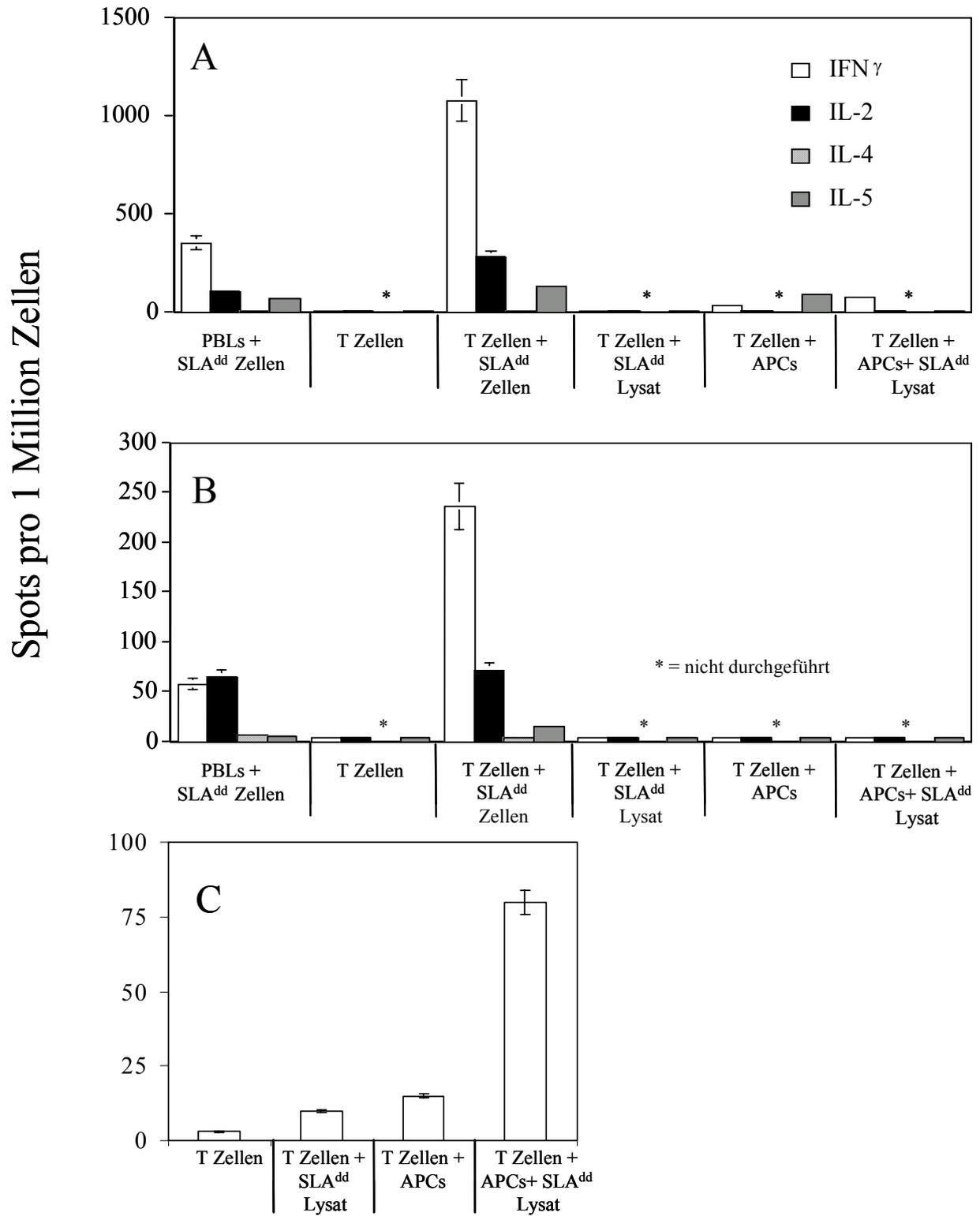
Als positive Kontrolle, um zu zeigen, dass das aus den Schweinezellen gewonnene Schweinezelllysate eine Restimulations-Immunantwort auslösen kann, falls eine existiert, isolierte ich gereinigte murine Milz-T-Lymphozyten 2 Wochen nach einer intraperitonealen Injektion von Schweinezellen und testete diese in ELISPOT Assays. Wie in Abbildung 4C gezeigt, reagierten die isolierten T-Zellen nicht auf syngene antigenpräsentierende Zellen oder auf Schweinezelllysate alleine, aber sie reagierten auf syngene antigenpräsentierende Zellen zusammen mit Schweinezelllysate, was indirekter Xenoreaktivität entspricht. Damit ist meine Beobachtung, dass menschliche T-Zellen als Antwort auf intakte Schweinezellen IFN- γ ausschütten, nicht jedoch als Antwort auf syngene antigenpräsentierende Zellen zusammen mit Schweinezelllysate, ein Nachweis der direkten Antigenpräsentation der Schweinezellen.

Abbildung 4 (siehe nächste Seite)

Die von xenoreaktiven PBMC produzierten Zytokine leiten sich von direkt und indirekt auf Schweinestimulatorzellen reagierenden T-Lymphozyten her. PBMC (35-40% CD3⁺ Durchflußzytometrie) oder isolierte, gereinigte T-Lymphozyten (>92% CD3⁺ Durchflußzytometrie) von zwei Freiwilligen (A und B) ohne diätetische Einschränkungen wurden mittels ELISPOT Assays getestet: mit Schweinestimulatorzellen, mit aus Schweinestimulatorzellen gewonnenem Schweinezelllysate, mit syngenen antigenpräsentierenden Zellen alleine und mit aus Schweinestimulatorzellen gewonnenem Schweinezelllysate zusammen mit syngenen antigenpräsentierenden Zellen. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei verschiedene Experimente. PHA-Stimulation ergab > 200 Spots pro Vertiefung für jedes Zytokin (nicht dargestellt).

C: 5 Millionen PBMC von Schweinen wurden naiven C57BL/6 Mäusen intraperitoneal injiziert. 14 Tage später wurden aus diesen Mäusen Milz-T-Lymphozyten mit Hilfe von murinen T-Zell-Isolierungssäulen (R&D Systems) gewonnen. Diese wurden in murinen IFN- γ ELISPOT Assays getestet. Jede der Säulen stellt den Mittelwert von doppelten Vertiefungen dar (<15% Variabilität zwischen den Vertiefungen).

Abbildung 4



Ein Vergleich der Häufigkeiten und der Zytokinprofile frisch isolierter T-Zellen, die über den direkten Weg auf Xeno- und auf Alloantigene reagieren, wird für 3 repräsentative Individuen in Tabelle III gegeben. Wie man sieht, war die direkte Xenoreaktivität durchweg mit einer höheren Frequenz messbar als die direkte Alloreaktivität; die Zytokinprofile, die durch die beiden unterschiedlichen Stimulatorzellsorten induziert wurden, waren hingegen in allen Fällen ähnliche, von IFN- γ dominierte Antworten. Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Daten, dass sich die gemessene, sich natürlich entwickelnde Xenoimmunantwort von T-Lymphozyten her ableitet, zum allergrößten Teil von der direkten Erkennung der Xenoantigene dominiert wird und mit einer höheren Häufigkeit messbar ist als die Antwort auf Alloantigene.

Tabelle III

Häufigkeit und Zytokinprofile von frisch isolierten und gereinigten menschlichen T-Lymphozyten als Antwort auf xenogene und allogene Stimulatorzellen (Spots pro 1 Million Zellen)

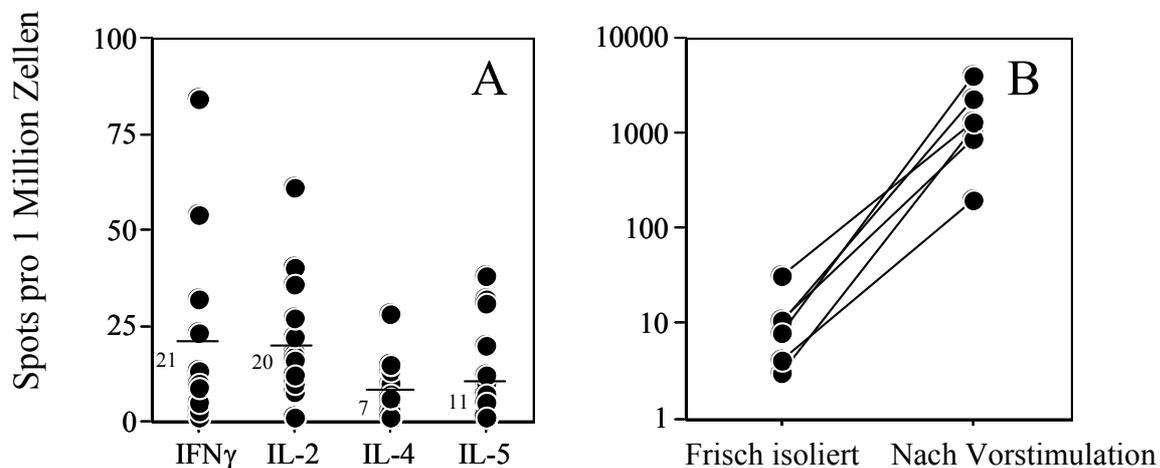
Freiwilliger	IFN- γ		IL-2		IL-4		IL-5	
	SLA ^{aa}	Allo						
A	1080	40	288	124	8	12	140	60
B	256	120	72	12	<5	<5	16	16
C	212	120	24	55	8	17	<5	<5

Humane T-Lymphozyten wurden aus menschlichen PBMC mit kommerziell erhältlichen T-Zell-Isolierungssäulen (R&D Systems) isoliert (>92% CD3⁺ laut Durchflusszytometrie; diese Daten werden hier nicht gezeigt). Sie wurden dann in Zytokin ELISPOT Assays mit xenogenen (SLA^{aa}) oder allogenen Stimulatorzellen (unterschieden sich an 4 bis 6 der A, B und DR Loci) getestet. Die spot-Häufigkeiten repräsentieren den Mittelwert von zwei Vertiefungen eines Individuums, ausgezählt mit computerunterstützter Bildanalyse. Es gab < 10 % Variabilität zwischen den einzelnen Vertiefungen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei verschiedene Experimente.

Wenn die schweinespezifische T-Zell-Immunantwort von Erwachsenen das Resultat des Kontakts mit Schweineantigenen in der Umwelt und/oder kreuzreagierender Gedächtnis-Antworten ist, dann sollten PBMC von Neugeborenen ohne vorhergehenden Kontakt mit diesen Antigenen keine signifikante Anzahl schweinespezifischer IFN- γ produzierender PBMC enthalten. Im Einklang mit dieser Hypothese steht mein Ergebnis, dass die Lymphozyten aus Nabelschnurblut ähnliche Häufigkeiten von IL-2 produzierenden Zellen, aber 10-50fach niedrigere Häufigkeiten von IFN- γ produzierenden Zellen enthielten als PBMC von Erwachsenen, wenn man sie mit Schweinezellen stimulierte (Abbildung 5A). Dies entspricht einem naiven Phänotyp der Nabelschnurblut-Lymphozyten. Es ist wichtig zu beachten, dass

sich diese Nabelschnurblut-Lymphozyten durch *in vitro* Vorstimulation mit Schweinestimulatorzellen zu einer starken IFN- γ Produktion in Form einer Gedächtnis-Antwort bringen lassen, was zeigt, dass diese Zellen von Neugeborenen die Fähigkeit besitzen, sich in Gedächtnis-Zellen umzuwandeln, die als Reaktion auf Schweinezellen IFN- γ produzieren. Eine Restimulation mit allogenen PBMC (nach der *in vitro* Vorstimulation mit Xenostimulatorzellen) ergab eine 10-15fach niedrigere Häufigkeit von IFN- γ Produzenten (75-180/eine Million Zellen, diese Daten werden hier nicht gezeigt) im Vergleich zu der Antwort auf Schweinezellen, was die Spezifität der induzierten Antwort zeigt.

Abbildung 5



Häufigkeit und Zytokinprofile von anti-Schwein xenoreaktiven PBMC aus Nabelschnurblut.

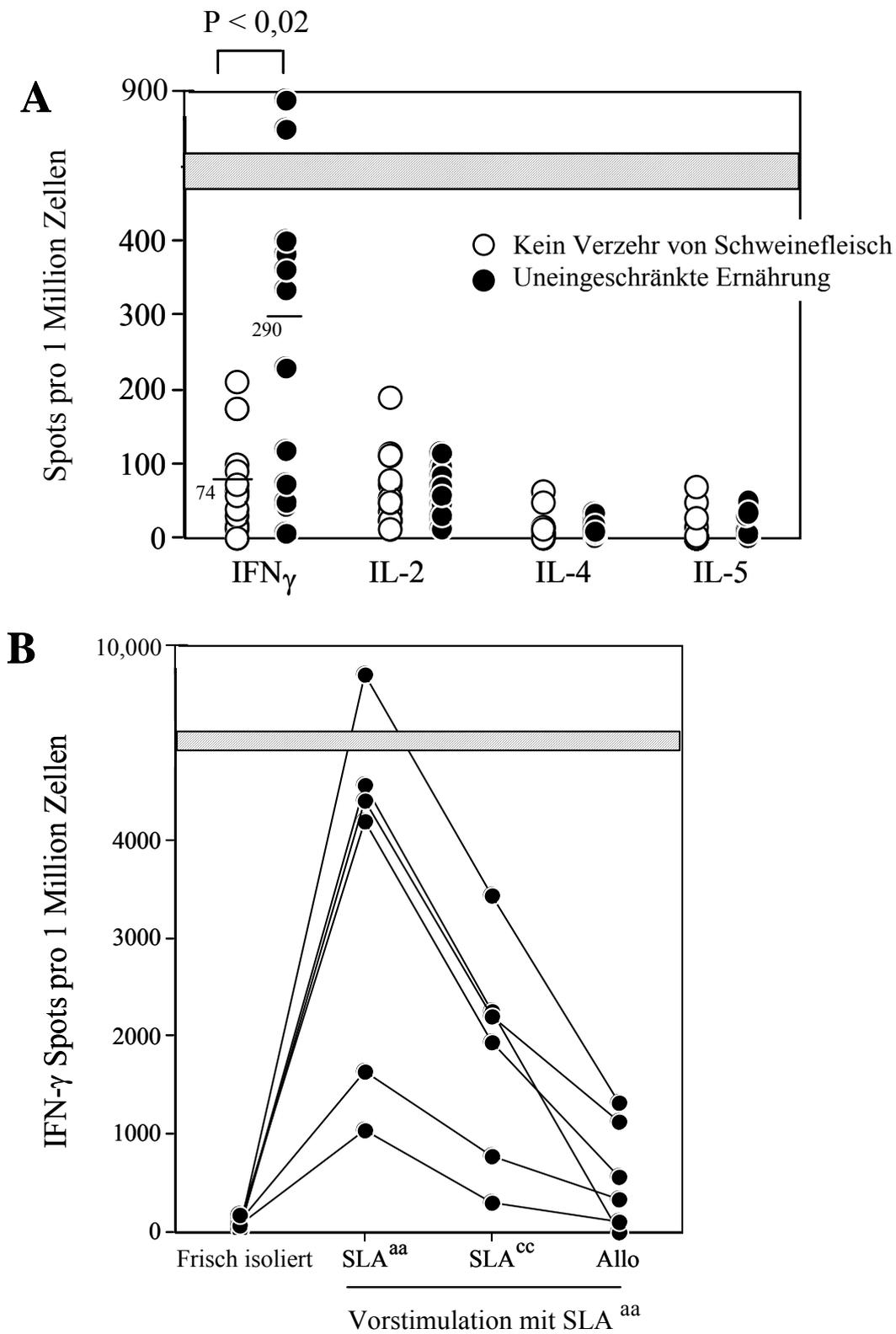
A: Aus 14 Nabelschnurblutproben isolierte Lymphozyten wurden in Zytokin ELISPOT Assays mit SLA^{aa} Schweinestimulatorzellen getestet. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von zwei Vertiefungen eines Individuums (< 10 % Variabilität zwischen den einzelnen Vertiefungen). Die Zahl neben jedem Satz an Datenpunkten ist der Mittelwert pro eine Million Zellen für alle getesteten Individuen. Stimulation mit SLA^{cc} oder SLA^{dd} ergab ähnliche Ergebnisse (diese Daten werden hier nicht gezeigt). PHA-Stimulation der Lymphozyten ergab >50 spots pro Vertiefung für IFN- γ und >200 spots pro Vertiefung für IL-2, IL-4 und IL-5 (diese Daten werden hier nicht gezeigt).

B: Frisch isolierte PBMC von 5 der Nabelschnurblutproben wurden entweder sofort in IFN- γ ELISPOT Assays mit SLA^{aa} Stimulatorzellen getestet oder *in vitro* mit SLA^{aa} Stimulatorzellen für 6 Tage stimuliert und dann in Restimations-Assays gegen SLA^{aa} Stimulatorzellen getestet. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von zwei Vertiefungen eines Individuums (< 10 % Variabilität zwischen den einzelnen Vertiefungen). Spezifitätskontrollen ergaben 75-180 spots/eine Million Zellen, wenn die mit SLA^{aa} stimulierten Zellen mit allogenen Zellen stimuliert wurden (diese Daten werden hier nicht gezeigt).

Des Weiteren untersuchte ich PBMC von mehreren Kindern (im Alter zwischen 6 und 24 Monaten) und stellte dabei ähnliches fest: Die Immunantwort gegen die Schweinezellen war von geringer Stärke und wurde von IL-2 dominiert, was einem naiven Phänotyp entspricht (Mittelwerte: $13/10^6$ Zellen bei IFN- γ , $51/10^6$ Zellen bei IL-2, $13/10^6$ Zellen bei IL-4 und $6/10^6$ Zellen bei IL-5, n=4). Zusammengefasst legen die Ergebnisse nahe, dass die sich natürlich entwickelnde Immunantwort gegen Schweinezellen, die sich bei Erwachsenen feststellen lässt, als Ergebnis von Kontakten mit Antigenen in unserer Umwelt herausbildet.

Obwohl sich eine kreuzreaktive Anti-Schwein Immunität durch den Kontakt mit einer Vielzahl von Antigenen aus unserer Umwelt (z.B. Viren, Transfusionen, Schwangerschaften) herausbilden könnte, wie man es zum Beispiel für Alloimmunität vermutet^{34,35}, ist eine mögliche Quelle des Kontakts mit Schweineantigenen der Genuss von Schweinefleisch. Falls der Genuss von Schweinefleisch ein wichtiger Faktor für das Ausbilden der schweinespezifischen zellulären Immunantwort ist, dann könnte man vermuten, dass Individuen, die kein Schweinefleisch verzehren, naive Antworten auf Schweineantigene zeigen, analog zu den Antworten, die bei Neugeborenen und Kleinkindern gefunden wurden. Um diese Fragestellung zu beleuchten, untersuchte ich PBMC von 14 erwachsenen Versuchspersonen, die in ihrem Leben kein Schweinefleisch verzehrt haben, auf schweinespezifische Immunantworten (Abbildung 6). Bemerkenswerterweise produzierten die PBMC dieser Individuen mit einer signifikant geringeren Häufigkeit IFN- γ als die der Individuen ohne diätetische Einschränkungen ($p < 0,02$, Abbildung 6), während die gemessenen Häufigkeiten bei der Produktion von IL-2, IL-4 und IL-5 keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Bei 6 der 14 getesteten Individuen (43%) war eine Produktion von IL-2 messbar, praktisch ohne dass IFN- γ produziert wurde (< 20 spots pro eine Million Zellen), was einem naiven Phänotyp bei der Zytokinproduktion entspricht (Abbildung 6A) und der Antwort bei den Nabelschnurblutproben gleicht (Abbildung 5). Die PBMC von diesen Individuen konnten jedoch auch wieder durch eine *in vitro* Vorstimulation dazu gebracht werden, IFN- γ als Antwort auf Schweinestimulatorzellen zu produzieren, was ihre Fähigkeit beweist, sich zu einem SLA spezifischen Gedächtnis-Phänotyp zu entwickeln (Abbildung 6B).

Abbildung 6



Häufigkeit und Zytokinprofile von anti-Schwein xenoreaktiven PBMC von Erwachsenen ohne bekannten Schweinefleischkonsum.

Abbildung 6 (siehe vorige Seite)

A: PBMC von 14 Individuen ohne bekannten Schweinefleischkonsum und die von 14 Individuen ohne diätetische Einschränkungen (diese Daten werden von Abbildung 2 zum direkten Vergleich übernommen) wurden in Zytokin ELISPOT Assays mit SLA^{aa} Schweinestimulatorzellen getestet. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von zwei Vertiefungen eines Individuums (< 10 % Variabilität zwischen den einzelnen Vertiefungen). Die Zahl neben jedem Satz an Datenpunkten ist der Mittelwert pro eine Million Zellen für alle getesteten Individuen. Eine statistische Analyse wurde mit Hilfe des Student t Tests durchgeführt. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die IL-2, IL-4 oder IL-5 Antworten. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich bei der Verwendung von SLA^{cc} oder SLA^{dd} Schweinestimulatorzellen (diese Daten werden hier nicht gezeigt). PHA-Stimulation ergab > 200 Spots pro Vertiefungen für jedes Zytokin (nicht dargestellt).

B: Frisch isolierte PBMC von 6 der Freiwilligen ohne bekannten Schweinefleischkonsum wurden entweder sofort in IFN- γ ELISPOT Assays mit SLA^{aa} Stimulatorzellen getestet oder in vitro mit SLA^{aa} Stimulatorzellen für 6 Tage stimuliert und dann in Restimulations-Assays gegen SLA^{aa} Stimulatorzellen, SLA^{cc} Stimulatorzellen und allogene Stimulatorzellen (als Spezifitätskontrolle) getestet. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von zwei Vertiefungen eines Individuums (< 10 % Variabilität zwischen den einzelnen Vertiefungen). Die gestrichelten Linien verbinden die Ergebnisse der spezifischen und der Kontrollantworten der einzelnen Individuen.

6 Diskussion

Es ist heute allgemein anerkannt, dass sich natürlich entwickelnde menschliche anti-Schwein Antikörper bedeutende Hindernisse auf dem Weg zu einer effektiven Xenotransplantation sind^{15,16}. Man glaubt, dass diese humorale Immunität Anteil hat an der hyperakuten und der verzögerten akuten (vaskulären) Xenotransplantatabstoßung durch die Aktivierung von Komplement mit darauf folgender Thrombose und Ischämie^{1,17}. Verschiedene Forschungslabore und Biotechnologiefirmen haben mit großen Anstrengungen neuartige Strategien entwickelt, die darauf zielen, diese Effekte zu vermeiden oder zu umgehen. Dazu gehört zum Beispiel die Herstellung genetisch veränderter Xenotransplantate, mit dem Ziel, diese resistent zu machen gegen diese durch Xenoantikörper und Komplement verursachte Zerstörung des Transplantats^{1,18,19,20,21,22,23}. Spätestens dann, wenn diese humoralen Hindernisse für die Xenotransplantation unter Kontrolle gebracht worden sind, wird man erhöhte Aufmerksamkeit auf die Auswirkungen von xenoreaktiven T-Lymphozyten und auf deren Rolle bei der Abstoßung von Xenotransplantaten richten müssen.

Neuere Studien zeigen, dass T-Lymphozyten Xenotransplantate sowohl durch den direkten als auch den indirekten Weg der Präsentation von Xenoantigenen erkennen, und dass T-Lymphozyten in der Abwesenheit von Antikörpern die Abstoßung von Xenotransplantaten vermitteln können^{25,26,27,28,36,37,38,39,40}. Solche Befunde verdeutlichen, dass eine effektive Kontrolle der T-Zell-Immunität notwendig ist, bevor die Xenotransplantation eine in der Routine einsetzbare, effiziente Methode der Behandlung von Organversagen im Endstadium sein kann.

Um die Immunantwort der T-Lymphozyten verstehen zu können, muss man sich mit der Rolle der MHC-Moleküle beschäftigen. Die physiologische Hauptfunktion der MHC-Moleküle besteht darin, Peptidfragmente von Pathogenen zu binden und sie auf der Zelloberfläche für T-Lymphozyten zu präsentieren. Wenn bei der Transplantation Unterschiede zwischen Spender und Empfänger bei den MHC-Molekülen bestehen, so richtet sich die Immunantwort des Empfängers gegen die fremden MHC-Moleküle. Diese Erkennung von Fremdan antigenen durch T-Lymphozyten erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen: die *direkte* und die *indirekte* Präsentation. Bei der *direkten* Präsentation von Fremdan antigenen kommt es zum Kontakt eines T-Lymphozyten des Empfängers mit einer Zelle des Spenders, die auf ihrem MHC-Komplex Spenderproteine präsentiert (Antigenpräsentierende Zelle des **Spenders**, Antigene des **Spenders** auf dem **Spender**-MHC-Komplex, T-Lymphozyt des Empfängers).

Bei der *indirekten* Präsentation von Fremdanthigenen kommt es zum Kontakt eines T-Lymphozyten des Empfängers mit einer antigenpräsentierenden Zelle des Empfängers, die auf ihrem MHC-Komplex Fremd- also Spenderproteine präsentiert (Antigenpräsentierende Zelle des **Empfängers**, Antigene des **Spenders** (bestehend aus Peptidfragmenten des MHC-Komplexes des **Spenders**, T-Lymphozyt des Empfängers).

Die hier vorliegenden Ergebnisse liefern deutliche Hinweise für die Anwesenheit einer sich natürlich entwickelnden Gedächtnis-T-Zell-Immunität im peripheren Blut Erwachsener, die sich gegen Antigene von Schweinen richtet. Die Arbeitsgruppe von Heeger et al. hat an anderer Stelle gezeigt ³⁰, dass die Möglichkeit, IFN- γ produzierende Zellen mit Hilfe des ELISPOT in Kurzzeitkulturen nachzuweisen, ein Maß für antigenspezifisches Gedächtnis ist. Zudem ist diese Methode signifikant sensitiver bei der Erfassung antigenspezifischer Immunität beim Menschen als andere verfügbare Assays ³⁰. Mit Hilfe des ELISPOTs kann ich hier zeigen, dass schweinespezifische IFN- γ produzierende T-Lymphozyten bei Erwachsenen problemlos und reproduzierbar nachweisbar sind, (Abbildungen 1 und 2) und dass die Frequenzen im Durchschnitt höher sind als die bei Allostimulation, mit denselben Techniken und bei denselben Individuen, ermittelten Werte (Abbildung 2, Tabelle I). Außerdem zeigt sich, dass es sich bei den gemessenen Antworten um die *direkte* Erkennung der Xenoantigene handelt, da isolierte gereinigte T-Lymphozyten in Abwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers IFN- γ produzierten, wenn sie durch Schweinezellen stimuliert wurden (Abbildung 4). Im Gegensatz zu den Blutproben von Erwachsenen enthielten Nabelschnurblut und Blutproben von Kleinkindern nur geringe Anzahlen von schweinespezifischen PBMC, die dabei in ihrem Zytokinprofil von IL-2 dominiert wurden, was einem naiven T-Lymphozyten-Phänotyp entspricht (Abbildung 5). Diese Zellen produzierten IFN- γ in 24h Restimulations-Assays, wenn sie vorher *in vitro* vorstimuliert wurden, was zum einen zeigt, dass diese Zellen tatsächlich in der Lage waren, IFN- γ zu produzieren, und zum anderen beweist, dass die Produktion von IFN- γ in Kurzzeitkultur im ELISPOT in der Tat ein Maß für eine bereits vorbestehende zelluläre Gedächtnis-Immunität ist. Folglich enthielten die Blutproben von Erwachsenen, aber nicht die von Neugeborenen und Kleinkindern, bereits stimulierte schweinespezifische T-Lymphozyten.

Die Anwesenheit von Gedächtnis-Zellen, die spezifisch für Xenoantigene sind, bereits vor einer möglichen Transplantation, könnte bedeutsame klinische Auswirkungen haben. Es erscheint in Analogie zu den Effekten von sich natürlich entwickelnden Xenoantikörpern

wahrscheinlich, dass die hohe Frequenz von bereits mit einer Gedächtnisantwort reagierenden schweinespezifischen T-Lymphozyten schon vor der Transplantation ein schlechtes Ergebnis der Transplantation und des Transplantatüberlebens eines Xenotransplantats vorhersagt. Die Möglichkeit, eine vorbestehende zelluläre Immunantwort auf xenogenes Gewebe zu messen, kann in Zukunft auch bei der Vorbereitung und der Kontrolle von Xenotransplantationen eingesetzt werden: So wird man unter den zur Verfügung stehenden Inzuchtschweinen das geeignete auswählen können, zu dem die geringste kreuzreagierende zelluläre Gedächtnis - Immunantwort besteht.

Gedächtnis-T-Lymphozyten besitzen geringere Aktivierungs- und Kostimulationsschwellen als naive T-Lymphozyten, und sie reagieren stärker/heftiger als naive Zellen, wenn sie restimuliert werden ^{41,42,43,44}. Hinzu kommt, dass Immuntoleranz in der Anwesenheit von vorstimulierten Gedächtnis-Zellen schwieriger zu erzeugen ist. Ausgehend von diesen Prinzipien ist es vernünftig anzunehmen, dass bereits vorstimulierte schweinespezifische T-Lymphozyten effektivere Mediatoren der Transplantatabstoßung/-zerstörung sein können als naive Zellen. Im Einklang mit dieser Feststellung stehen Veröffentlichungen von Heeger et al., die zeigen, dass eine große Frequenz von spenderspezifischen Gedächtnis-T-Lymphozyten vor der (Allo-) Transplantation mit einem erhöhten Risiko akuter Abstoßungs-episoden nach Nierentransplantation (sowohl bei lebenden als auch bei Leichenspendern) korreliert ³⁰.

Weiterhin wird es möglich sein, den Verlauf der Immunreaktion nach der Transplantation zu beobachten und so eventuell die immunsuppressive Behandlung an die jeweilige Stärke der Immunantwort angepasst zu dosieren, um das Immunsystem des Transplantatempfängers nicht übermäßig zu supprimieren.

Die Ursache für die hohen Frequenzen der schweinespezifischen Gedächtnis-T-Lymphozyten sollte weiter untersucht werden; meine Ergebnisse bieten jedoch eine mögliche Erklärung für diesen Befund. Zum einen weist die Tatsache, dass die T-Lymphozyten von Neugeborenen und Kleinkindern keine signifikante Gedächtnis-Immunantwort auf Schweineantigene aufweisen (Abbildung 4), darauf hin, dass sich diese Immunantwort durch den Kontakt mit der Umwelt entwickelt. So könnten T-Lymphozyten, die durch eine Vielzahl von Antigenen stimuliert wurden (z.B. durch Bluttransfusionen, Impfungen, Schwangerschaften, Virusinfektionen, usw.) mit Schweineantigenen kreuzreagieren. Weiterhin geht aus meinen Ergebnissen hervor, dass bei zumindest manchen Individuen der Konsum von Schweinefleisch zu der Ent-

wicklung einer schweinespezifischen Gedächtnis-T-Zellantwort beiträgt. Ich konnte zeigen, dass die PBMC von Individuen, die nie wissentlich Schweinefleisch verzehrt hatten, weniger schweinespezifische IFN- γ produzierende Zellen aufwiesen als die PBMC von Erwachsenen ohne diätetische Einschränkungen (Abbildung 6). Hinzu kommt, dass die PBMC mehrerer dieser Versuchspersonen bei dem Kontakt mit Schweinezellen einen naiven T-Lymphozyten-Phänotyp zeigten (insgesamt geringe Häufigkeit und von IL-2 dominiert), der dem der Neugeborenenimmunantwort sehr ähnlich ist (Abbildungen 5A, 6A). Die PBMC dieser Individuen konnten jedoch ebenfalls *in vitro* dazu stimuliert und umgewandelt werden, spezifisch IFN- γ zu produzieren, was bestätigt, dass diese Zellen unter bestimmten Stimulationsbedingungen in der Lage sind, IFN- γ zu produzieren. Das Auffinden von schweinespezifischen PBMC bei einigen der Versuchspersonen, die kein Schweinefleisch verzehrt haben, ist durch eine Vielzahl von Faktoren erklärbar: So kann es sich zum Beispiel um den Effekt von unbeabsichtigtem/unbekanntem Verzehr von Schweinefleisch oder von kreuzreagierender Immunität auf andere Antigene aus der Umwelt handeln.

Meine Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die gegen Schweineantigene gerichtete, zytokinproduzierende, zelluläre Immunantwort bei Erwachsenen ohne diätetische Einschränkung stärker ist als die Alloantwort (ungefähr zweimal so stark). Sie kann mit Häufigkeiten von bis zu einer Zelle auf 1200 PBMC (Abbildungen 2 und 3, Tabelle III) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Prinzip im Einklang mit denen von Murray et al.⁴⁵ über IL-2 produzierende menschliche T-Lymphozyten, obwohl die von mir gemessenen Häufigkeiten im Schnitt etwas niedriger lagen als die früher beschriebenen. Diese geringen Unterschiede lassen sich wahrscheinlich durch technische Unterschiede erklären, so zum Beispiel durch die Verwendung eines 96 h dauernden *limiting dilution assays*, der im Gegensatz zu meinem Versuchsaufbau eines 24 h dauernden ELISPOTs eventuell *in vitro priming* und/oder klonale Expansion⁴⁵ zulässt.

Das xenospezifische Zytokinprofil wurde in meinen Studien von IFN- γ auf überwältigende Weise dominiert, IL-4 und IL-5 waren nur in sehr geringem Umfang messbar. Außerdem maß ich keine xenospezifische T-Lymphozytenproduktion von IL-10 (*diese Daten werden hier nicht gezeigt*). Verschiedene Experimentalmodelle der Xenotransplantation haben die Typ-2 Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 als wichtige Mediatoren des Abstoßungsprozesses postuliert^{1,46}. Meine Ergebnisse widerlegen diese Funde nicht, sondern legen dar, dass das Zytokinprofil vor der Xenotransplantation von IFN- γ dominiert wird.

Obwohl die indirekte Xenoreaktivität in verschiedenen Tiermodellen als bedeutende Komponente der Immunantwort während der Abstoßung von Xenotransplantaten gezeigt worden ist

^{1,26,27}, implizieren meine Versuchsergebnisse, dass die Xenoimmunantwort von Menschen durch die direkte Xenoreaktivität dominiert wird. Gereinigte isolierte T-Lymphozyten reagierten auf Schweinestimulatorzellen, aber nicht auf eine ultraschallzerkleinerte Präparation von Schweinezellen mit oder ohne die Zugabe syngener antigenpräsentierender Zellen (Abbildung 3, die Arbeitsgruppe von Heeger et al. hat gezeigt, dass sich mit dieser Methode indirekte Alloreaktivität messen lässt ³³). Diese Versuchsergebnisse bestätigen frühere Studien mehrerer Arbeitsgruppen, dass menschliche T-Lymphozyten Xenoantigene, die auf xeno-genen Zellen exprimiert sind, direkt erkennen und auf sie reagieren können ^{1,25,26,45,47}. Ob die Abstoßungsantwort nach der Xenotransplantation auf ähnliche Weise durch direkte Erkennung der Xenoantigene oder alternativ durch indirekte Xenoreaktivität mediiert wird, muss in weiteren Untersuchungen herausgefunden werden.

Es ist äußerst interessant, dass der Verzehr von Schweinefleisch mit einer immunologischen Gedächtnisantwort auf intaktes SLA (\pm Peptid) assoziiert ist (direkte Xenoreaktivität). Man könnte eher erwarten, dass es sich um indirekt präsentierte Schweineantigene handeln würde, die mit HLA-Molekülen komplexiert wären. Obwohl die Ursache für dieses Ergebnis unklar bleibt, ist es anerkannte Tatsache, dass M-Zellen im Darm intakte Makromoleküle über Epithelbarrieren hinweg transportieren können ^{48,49}. Bei einem solchen Szenario erscheint es möglich, dass die orale Aufnahme von Schweinefleisch zu einer Interaktion von M-Zell-assoziierten Darm-infiltrierenden Lymphozyten mit direkt präsentierten SLA-Molekülen führt. Auf diesem Weg könnte sich eine zelluläre Gedächtnis-Immunantwort bilden.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass diese Versuchsergebnisse den ersten Beweis für die Anwesenheit einer vorbestehenden T-Lymphozyten Immunität gegenüber Schweineantigenen bei erwachsenen Versuchspersonen liefern. Das nachgewiesene Ausmaß dieser Immunantwort legt nahe, dass sie ein bedeutendes Hindernis bei der Transplantation von Schweineorganen darstellen wird. Insofern bleibt die Suche nach einer Möglichkeit gegen zumindest die wichtigsten Antigen determinanten, die hier eine Rolle spielen, Toleranz zu erzeugen, eines der wichtigsten Ziele der Xenotransplantationsforschung.

Die Zeit, die benötigt wird, die Probleme medizinisch-technischer Art zu lösen, sollte allerdings dringend dazu genutzt werden, ethische Aspekte der Xenotransplantation zu diskutieren. Hierbei sind nämlich viele ethische Fragen, die mit der Transplantation von Schweineorganen in Menschen verbunden sind, noch bei weitem nicht geklärt. Sowohl in der wissen-

schaftlichen als auch in der öffentlichen Diskussion ist dieses Thema heftig umstritten^{10,50,51}. So schafft man durch Xenotransplantationen Chimären, das heißt Mischwesen, die sowohl menschliches als auch tierisches Erbgut besitzen. Was bedeutet es für einen Xenotransplantatempfänger, als lebenswichtigen Bestandteil des eigenen Körpers ein tierisches Organ in sich zu tragen? Auf der anderen Seite dieser Frage stehen die transgenen Schweine, die momentan gezüchtet werden: Sind diese Manipulationen an Säugetieren mit dem Gedanken des Tierschutzes zu vereinbaren? Diese Probleme mögen überspitzt dargestellt scheinen, eine zufriedenstellende Antwort auf diese Fragen gibt es jedoch noch nicht.

Auch verschiedene rechtliche Fragen sind noch lange nicht beantwortet: Hierbei dreht es sich vor allem um eine Frage, die momentan bei vielen modernen (medizinischen) Technologien kontrovers diskutiert wird: Wie wägt man das Wohl des Einzelnen, d.h. des Patienten, gegenüber den Interessen der Allgemeinheit ab? Hierbei sollte die Allgemeinheit bzw. deren Vertreter auch ein Mitspracherecht haben, denn dem unmittelbaren Vorteil für den Patienten, durch ein Schweineorgan eine Lebensverlängerung und/oder Verbesserung der Lebensqualität zu erhalten, steht die potentielle Gefährdung der Allgemeinheit durch Krankheitserreger, die durch die Xenotransplantation an die humane Population adaptiert werden, gegenüber.

Dass dabei auch Fortschritte, die bei der Überwindung der Abstoßungsreaktion gemacht werden, zu zusätzlichen Gefahren beitragen können, können die folgenden Beispiele belegen:

Viele tierische Viren mit Lipidhüllen werden von menschlichem Komplement lysiert. Dies wird durch das Binden von anti- α -Gal-Antikörpern an α -Gal Reste auf der Virushülle ausgelöst. Diese α -Gal Reste finden sich vor allem bei Viren, die sich in Zellen von Nicht-Primaten entwickeln. Die Konsequenz aus dieser Tatsache ist die, dass alle Anstrengungen, die darauf zielen, Schweine-Xenotransplantate gegen die HAR zu schützen, möglicherweise Viren, die Hüllen besitzen, die Oberflächenantigene von Schweinen tragen, ebenso vor der menschlichen Immunantwort schützen.

Hinzu kommt, dass transgene Schweine mit menschlichen Oberflächenproteinen möglicherweise tierischen Viren die Chance bieten, sich an den Menschen anzupassen und so dann leichter Spezies-Barrieren zu überwinden.

An der Diskussion über die Zukunft der Xenotransplantation beteiligen sich verschiedene Interessensgruppen: Patienten, Ärzte, Biotechnologiefirmen (Die Forschungs- und Entwicklungskosten der Xenotransplantation sind erheblich; für die Organe werden hohe Preise verlangt und bezahlt werden).

Zusätzlich zu den ohnehin schon aus Eigeninteresse an dieser Diskussion teilnehmenden Gruppen muss die Öffentlichkeit informiert werden. Da die Infektionsgefahr durch die Übertragung von Schweineorganen nicht nur die Empfänger sondern die gesamte Bevölkerung betrifft, ist es essentiell, dass die Bevölkerung über die Fortschritte bei der Xenotransplantation informiert wird und an der Entscheidung, welches Risiko man bereit ist einzugehen, beteiligt wird. Nur dann, wenn irrationale Ängste durch sachliche Informationen eingedämmt werden und die Risiken beim Namen genannt werden, kann die Xenotransplantation unter breiter Akzeptanz eingesetzt werden.

Wenn ich in Anbetracht all dieser ethischen Fragen und Probleme nochmals auf meine eigenen Ergebnisse zurückkomme, dann tue ich das, um aus meiner Sicht eine Prognose für die weitere Entwicklung der Xenotransplantation abzugeben:

Die Ergebnisse meiner Arbeit sind ein weiterer Baustein in unserer Kenntnis der immunologischen Vorgänge bei der Xenotransplantation von Schwein zu Mensch. Sie lassen vermuten, dass auch die zelluläre Immunantwort eine große Barriere vor einem routinemäßigen Einsatz dieser Behandlung darstellen wird. Die großen Anstrengungen, die momentan auf diesem Forschungsgebiet gemacht werden, werden mit großer Wahrscheinlichkeit im Lauf des nächsten Jahrzehnts zu deutlichen Fortschritten führen. Die wissenschaftliche Gemeinde ist sich jedoch auch der möglichen Risiken und Probleme bewusst; eine lebhafte Diskussion über die medizinischen und damit untrennbar verbundenen ethischen Fragen ist im Gange. Alle Forschungsergebnisse und später alle klinischen Studien werden notwendigerweise mit besonders strengen Kriterien geprüft werden müssen.

7 Abstract

Naturally developing xenospecific antibodies are a well-documented major barrier to xenograft transplantation in humans, but whether analogous xenoreactive T cell immunity develops is not known. I used an enzyme-linked immunospot assay to determine the frequency and cytokine profiles of xenoreactive PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) from a panel of human volunteers. Because naive T- cells produce only Interleukin-2 (IL-2) in short term culture, Interferon- γ (IFN- γ) production by this approach is a measure of a memory immune response. Stimulation of human PBMCs or purified T-lymphocytes with stimulator cells from inbred swine revealed a high frequency of IFN- γ producers with 5-fold fewer IL-2 producers. In contrast, lymphocytes obtained from neonatal umbilical cord blood contained swine-specific IL-2 producers but few IFN- γ producers, which is what one would expect to find with a naive phenotype. Moreover, PBMCs from adults with a history of abstention from pork consumption responded to swine cells with a significantly lower frequency of IFN- γ producers than PBLs from adults with unrestricted diets did, suggesting that pork consumption may result in priming of swine-specific T cell immunity. My findings provide the first evidence for naturally occurring xenospecific T cell immunity in humans. The detected strength of this memory response suggests that it will present a formidable barrier to transplantation of swine organs.

8 Zusammenfassung

Sich natürlich entwickelnde xenoreaktive Antikörper sind die wichtigsten Hindernisse für die Übertragung von Xenotransplantaten, aber ob sich eine analoge xenoreaktive T-Zell-Immunität entwickelt, ist unbekannt. Ich habe einen *enzyme-linked immunospot assay* (ELISPOT) eingesetzt, um die Häufigkeit und das Zytokinausschüttungsprofil xenoreaktiver Lymphozyten aus peripherem Blut bei einer Gruppe gesunder Versuchspersonen zu bestimmen. Weil naive T-Zellen nur Interleukin-2 und kein Interferon- γ in Kurzzeitkulturen produzieren, ist die bei dieser Vorgehensweise gemessene Produktion von Interferon- γ ein Maß für die Gedächtnisantwort der zellulären Immunität. Stimulierung von menschlichen PBMC (peripheral blood mononuclear cells) oder gereinigten T-Lymphozyten mit Hilfe von PBMC von Inzucht-Schweinen ergab eine große Anzahl von Interferon- γ produzierenden Zellen und etwa fünfmal weniger Interleukin-2 produzierende Zellen. Im Gegensatz dazu enthielten aus menschlichem Nabelschnurblut gewonnene Lymphozyten zwar schweinespezifisch reagierende Interleukin-2 produzierende Zellen, aber wenige Interferon- γ produzierende Zellen, was einem naiven Phänotyp entspricht. Hinzu kommt, dass PBMC von Erwachsenen, die nie in ihrem Leben Schweinefleisch konsumiert haben, mit einer signifikant geringeren Anzahl von Interferon- γ Produzenten auf Schweinezellen reagierten, als das bei Erwachsenen ohne Einschränkungen in ihrer Nahrungsaufnahme der Fall war. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Aufnahme von Schweinefleisch möglicherweise zum Entstehen einer schweinespezifischen T-Zell-Immunität führt.

Die vorliegenden Ergebnisse sind die ersten Belege für natürlich auftretende xenospezifische T-Zell-Immunität bei Menschen. Die hohe Frequenz dieser Gedächtnisantwort spricht dafür, dass sie eine große Barriere bei der Transplantation von Schweineorganen darstellen wird.

9 Danksagung

Ich danke Prof. Bein für die Ermöglichung dieser Dissertation und die konstruktiven Ratschläge bei der Konzeption meiner Arbeit. Ich danke Herrn Dr. Peter Heeger, unter dessen Anleitung ich an der Case Western Reserve University School of Medicine in Cleveland, Ohio, USA, die experimentellen Arbeiten durchgeführt habe und der mir viel über das wissenschaftliche Arbeiten vermittelte.

Ich danke meiner Familie, deren Unterstützung die Durchführung dieser Doktorarbeit möglich gemacht hat.

Außerdem bedanke ich mich bei der Studienstiftung des deutschen Volkes, die mich bei meinem Aufenthalt in den USA finanziell unterstützte.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Hartig
Vornamen:	Carsten Volker
Geburtsdatum:	27.2.1975
Geburtsort:	Mannheim-Neckarau
Anschrift:	Trendelstraße 12 1/3, 86156 Augsburg
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

1981 - 1985	Grundschule in Grünstadt
1985 - 06/1994	Leininger-Gymnasium-Grünstadt
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,2)

Hochschulbildung:

04/1995 – 03/2001	Justus-Liebig-Universität Gießen: Studiengang Humanmedizin
04/1996 – 03/2001	Doppelstudium Magisterstudiengang Anglistik
04/1997	Physikum (Note: gut, 2,0)
04/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut, 2,0)
03/2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut, 1,66)
04/2001 – 03/2002	Praktisches Jahr an der Universität Würzburg (Radiologie, Innere Medizin, Chirurgie)
30.4.2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut, 2,0) Gesamtnote: gut (1,83)

Stipendium:

03/1998 – 03/2002 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Auslandsaufenthalt:

10/1998 – 10/1999 Forschungsaufenthalt an der Case Western
Reserve University, Cleveland, OH, USA

Berufliche Tätigkeit:

06/2002 – 11/2003 Arzt im Praktikum, II. Medizinische Klinik
(Prof. Dr. Schlimok), Zentralklinikum Augsburg
seit 12/2003 Assistenzarzt, II. Medizinische Klinik
(Prof. Dr. Schlimok), Zentralklinikum Augsburg

Veröffentlichungen:

- 1) **Hartig, C. V.**, Haller, G. W., Sachs, D. H., Kuhlenschmidt, S., Heeger, P. S. (2000). Naturally Developing Memory T Cell Xenoreactivity to Swine Antigens in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 164: 2790-2796
- 2) Valujskikh, A., **Hartig, C.**, Heeger, P. S. (2001). Indirectly primed CD8⁺ T Cells are a Prominent Component of the Allogeneic T-Cell Repertoire after Skin Graft Rejection in Mice. *Transplantation* 71: 418-421

11 Literaturverzeichnis

-
- ¹ Jr Auchincloss, H., D. Sachs. 1998. Xenogeneic Transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 16:433.
- ² Platt, J. 1996. Xenotransplantation: recent progress and current perspectives. *Current Opinion in Immunology* 8:721
- ³ Platt, J., R. Fischel, A. Matas, S. Reif, R. Bolman, F. Bach. 1991. Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 52:214.
- ⁴ Platt, J., S. Saadi. 1998. Immunology of Xenotransplantation. *Life Sciences* 62:365
- ⁵ Samstein, B., J. Platt. 2001. Physiologic and Immunologic Hurdles to Xenotransplantation. *J Am Soc Nephrol* 12:182
- ⁶ Van der Laan, L.J.W., C. Lockey, B.C. Griffeth, F.S.Frasier, C.A. Wilson, D.E. Onions, B.J. Hering, Z. Long, E. Otto, B. E. Torbett, D.R. Salomon. 2000. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 40: 90
- ⁷ Patience, C., Y. Takeuchi, R.A. Weiss. 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Medicine* 3,3:282
- ⁸ Le Tissier, P., J.P. Stoye, Y. Takeuchi, C.Patience, R.A. Weiss. 1997. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* 389:681
- ⁹ Archer, K., F. McLellan. 2002. Controversy surrounds proposed xenotransplant trial. *The Lancet* 9310:949
- ¹⁰ Weiss, R.A.. 1998. Transgenic pigs and virus adaption. *Nature* 391:327
- ¹¹ Martin, U., V. Klessig, J.H. Blusch. 1998. Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 352:692
- ¹² Heneine, W., A. Tibell, W.M. Switzer. 1998. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 352: 695
- ¹³ Patience, C., G.S. Patton, Y.Takeuchi. 1998. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 352: 699
- ¹⁴ Platt, J.L.. 2000. Xenotransplantation: New risks, new gains. *Nature* 407:27
- ¹⁵ Oriol, R., Y. Ye, E. Koren, D. Cooper. 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.

- ¹⁶ Platt, J., B. Lindman, R. Geller, H. Noreen, J. Swanson, A. Dalmaso, F. Bach. 1991. The role of natural antibodies in the activation of xenogeneic endothelial cells. *Transplantation* 52:1037.
- ¹⁷ Sandrin, M., H. Vaughan, I. McKenzie. 1994. Identification of Gal (α 1,3) Gal as the major epitope for pig-to-human vascularized xenografts. *Transplant. Rev.* 8:134.
- ¹⁸ Kearns-Jonker, M., D. Cramer, L. Dane, J. Swensson, L. Makowka. 1997. Human serum reactivity to porcine endothelial cells after antisense-mediated down-regulation of GpIIIa expression. *Transplantation* 63:588.
- ¹⁹ Byrne, G., K. McCurry, M. Martin, S. McClellan, J. Platt, J. Logan. 1997. Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 63:149.
- ²⁰ Dalmaso, A., G. Vercellotti, J. Platt, F. Bach. 1991. Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. *Transplantation* 52:530.
- ²¹ Rydberg, L., E. Hallberg, S. Bjorck, S. Magnusson, V. Strokan, B. Samuelsson, M. Breimer. 1995. Studies on the removal of anti-pig xenoantibodies in the human by plasmapheresis/immunoabsorption. *Xenotransplantation* 2:253.
- ²² Taniguchi, S., F. Neethling, E. Korchagina, N. Bovin, Y. Ye, T. Kobayashi, M. Niekrasz, S. Li, E. Koren, R. Oriol, D. Cooper. 1996. In vivo immunoabsorption of anti-pig antibodies in baboons using a specific Gal(α 1-3)Gal column. *Transplantation* 62:1379.
- ²³ Sandrin, M., W. Fodor, E. Mouhtouris, N. Osman, S. Cohny, S. Rollins, E. Guilmette, E. Setter, S. Squinto, I. McKenzie. 1995. Enzymatic remodeling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nat. Med.* 1:1261.
- ²⁴ Logan J.. 2000. Prospects for Xenotransplantation. *Current Opinion in Immunology.* 12:563
- ²⁵ Friedman, T., A. Shimizu, R. Smith, R. Colvin, J. Seebach, D. Sachs, J. Iacomini. 1999. Human CD4⁺ T cells mediate rejection of porcine xenografts. *J. Immunol.* 162:5256.
- ²⁶ Yamada, K., D. Sachs, H. DerSimonian. 1995. Human anti-porcine xenogeneic T cell response: evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J. Immunol.* 155:5249.
- ²⁷ Moses, R., R. Pierson, J. Winn, H. Auchincloss. 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.
- ²⁸ Korsgren, O.. 1997. Acute cellular xenograft rejection. *Xenotransplantation* 4:11.
- ²⁹ Sachs D., F. Bach. 1990. Immunology of xenograft rejection. *Hum. Immunol.* 28:245

- ³⁰ Heeger, P., N. Greenspan, S. Kuhlenschmidt, C. DeJelo, D. Hricik, J. Shulak, M. Tary-Lehmann. 1999. Pretransplant frequency of donor-specific IFN- γ -producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J. Immunol.* 163:2267.
- ³¹ Hopkins, K.. 1993. Basic microlymphocytotoxicity test. In *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics Manual*. A. Nikaiein, ed. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Lenexa, KS, I.B.1.1.
- ³² Olerup, O., H. Zetterquist. 1992. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39:225.
- ³³ Benichou, G., A. Valujskikh, P. Heeger. 1999. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J. Immunol.* 162:352.
- ³⁴ Lechler, R., T. Heaton, L. Barber, V. Bal, J. Batchelor, G. Lombardi. 1992. Molecular mimicry by major histocompatibility complex molecules and peptides accounts for some alloresponses. *Immunol. Lett.* 34:63.
- ³⁵ Lombardi, G., S. Sidhu, M. Daly, J. Batchelor, W. Makgoba, R. Lechler. 1990. Are primary alloresponses truly primary?. *Int. Immunol.* 2:9.
- ³⁶ Pierson, R., H. Winn, P. Russell, H. Auchincloss. 1989. Xenogeneic skin graft rejection is especially dependent on CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 170:991.
- ³⁷ Coleman, T., H. Pittman, S. Purser, C. Haisch, K. Verbanac. 2001. *J. Surg. Res.* 97:184.
- ³⁸ Olack B., P. Manna, A. Jaramillo, N. Steward, C. Swanson, D. Kaesberg, N. Poindexter, T. Howard, T. Mohanakumar. 2000. Indirect Recognition of Porcine Swine Leukocyte Ag Class I Molecules Expressed on Islets by Human CD4⁺ T Lymphocytes. *J. Immunol.* 165:1294.
- ³⁹ Shishido, S., B. Naziruddin, X. C. Xu, T. Howard, T. Mohanakumar. 1998. Indirect recognition of porcine xenoantigens by human CD4⁺ T cell clones. *Transplantation* 65:706.
- ⁴⁰ Gill, R. G.. 1992. The role of direct and indirect antigen presentation in the response to islet xenografts. *Transplant. Proc.* 24:642.
- ⁴¹ Viola, A., A. Lanzavecchia. 1996. T cell activation determined T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273:104.
- ⁴² Pihlgren, M., P. Dubois, M. Tomkowiak, T. Sjogren, J. Marvel. 1996. Resting memory CD8⁺ T cells are hyperactive to antigenic challenge in vitro. *J. Exp. Med.* 184:2141.
- ⁴³ Curtsinger, J., D. Lins, M. Mescher. 1998. CD8⁺ memory T cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) are more sensitive than naive cells (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen. *J. Immunol.* 160:3236.

-
- ⁴⁴ Mondino, A., A. Khoruts, M. Jenkins. 1996. The anatomy of T cell activation and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2245.
- ⁴⁵ Murray, A. G., M. M. Khodadoust, J. S. Pober, A. L. Bothwell. 1994. Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity* 1:57.
- ⁴⁶ Wren, S., S. Wang, N. Thai, B. Conrad, R. Hoffman, J. Fung, R. Simmons, S. Ildstad. 1993. Evidence for early Th2 T cell predominance in xenoreactivity. *Transplantation* 56:905.
- ⁴⁷ Alter, B. J., F. H. Bach. 1990. Cellular basis of the proliferative response of human T cells to mouse xenoantigens. *J. Exp. Med.* 171:333.
- ⁴⁸ Owen, R.. 1977. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology* 72:440.
- ⁴⁹ Neutra, M., T. Phillips, E. Mayer, D. Fishkind. 1987. Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res.* 247:537.
- ⁵⁰ Bach, F.H., A.J. Ivinson. 2002. A shrewd and ethical approach to xenotransplantation. *Trends in Biotechnology* 20,3:129.
- ⁵¹ Bach, F.H., A.J. Ivinson, C. Weeramantry. 2000. Ethical and legal issues in technology: Xenotransplantation. *American Journal of Law & Medicine* 27,2&3:283.