

Aus der Medizinischen Klinik II
des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin
Abteilung für Kardiologie und Pulmologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiss

Transfer der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie
in die SCID-Maus :
Immunologische und hämodynamische Evaluierung der Tiere

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs
Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: Gerhard Rohn
aus : Rheydt

Referent: Prof. Dr. P.-L. Schwimmbeck

Koreferent: Prof. Dr. H. Zeichhardt

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12.12.2003

Für meine Frau Brinja-Lara
und
meine Kinder Paul und Neele

VII. Zusammenfassung

Severe combined immunodeficiency-(SCID)-Mäuse besitzen weder eigene T- noch B-Lymphozyten und haben daher eine Immuntoleranz gegenüber humanen immunkompetenten Zellen. Da eine Virus-getriggerte Immunantwort gegen Herzmuskelstrukturen in der Pathogenese der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie vermutet wird, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich periphere Blutlymphozyten (PBL's) von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie in SCID-Mäuse transferieren lassen und ob sie dort einen autoimmunologischen Effekt haben. Ziel war es, die in den Patienten festgestellten linksventrikulären Pumpfunktionsstörungen und Autoimmunphänomene wie Adenin-Nukleotid-Translokator-spezifische Autoantikörper, erhöhte Serumspiegel an löslichem Interleukin-2-Rezeptor, erhöhte Serumspiegel an Interleukin-6 und Interleukin-8 und lymphozytäre Infiltrate im Myokard durch den Transfer ihrer PBL's in die SCID-Maus zu übertragen. Dazu wurden jeweils 50×10^6 PBL's von 9 Patienten und 4 herzgesunden Kontrollen intraperitoneal in mindestens je 2 SCID-Mäuse injiziert. 60 Tage nach dem Transfer von PBL's aus Patienten und herzgesunden Kontrollen konnte im Serum der SCID-hu-PBL-Maus humanes IgG (bis 3925 mg/l), humanes IgM (bis 2590 mg/l), löslicher Interleukin-2-Rezeptor (bis 245 pmol/l), Interleukin-6 (bis 27,0 pg/ml) und Interleukin-8 (bis 140 pg/ml) nachgewiesen werden. Es fanden sich humane Lymphozyten in der Peripherie (bis 22% der mononukleären Zellen). Bei allen Tieren, sowohl bei denen, die PBL's aus erkrankten bzw. herzgesunden Spendern injiziert bekommen hatten, als auch bei den unbehandelten Tieren, wurden 60 Tage nach dem Transfer im steady state die Druckanstiegsgeschwindigkeiten, die Herzfrequenzen und die Drücke im linken Ventrikel ermittelt. SCID-Mäuse, die PBL's von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie erhalten hatten, wiesen im Gegensatz zu den Tieren, in die PBL's von herzgesunden Kontrollen transfundiert worden waren, statistisch signifikant humane Autoantikörper gegen den ANT, erhöhte Spiegel an humanem sIL-2-Rezeptor, erhöhte Spiegel an Interleukin-6 und Interleukin-8 und vermehrt humane lymphozytäre Infiltrate im Myokard auf. Mäuse, die mit PBL's von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie rekonstituiert worden waren, zeigten eine statistisch signifikante Erniedrigung der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeiten bei vergleichbaren Herzfrequenzen und Ventrikeldrücken im Vergleich zu den Tieren, die mit PBL's von herzgesunden Kontrollen rekonstituiert worden waren bzw. zu den Tieren, die keine PBL's injiziert bekommen hatten.

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich die von den Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie bekannten linksventrikulären Funktionsstörungen und Autoimmunphänomene durch den Transfer ihrer PBL's in der SCID-Maus reproduzieren lassen. Die SCID-hu-PBL-Maus stellt somit ein geeignetes Modell dar, um die Bedeutung autoimmunologischer Vorgänge bei der Pathogenese der inflammatorischen Kardiomyopathie des Menschen in vivo zu untersuchen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	4
II. Material und Methoden	12
<i>II.1 Material</i>	12
II.1.1 Versuchstiere	12
II.1.2 Chemikalien	
II.1.3 Geräte	12
<i>II.2 Methoden</i>	13
II.2.1 Patienten und Kontrollen	13
II.2.2 Handhabung und Haltung der Versuchstiere	19
II.2.3 Isolierung der Lymphozyten und Transfer derselben in die SCID-Maus	20
II.2.4 Durchfluß-Zytometrie	21
II.2.5 Quantitative Bestimmung von Maus-IgG	24
II.2.6 Quantitative Bestimmung von humanem IgG und IgM	26
II.2.7 Bestimmung der humanen Auto-Antikörper gegen den Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT)	28
II.2.7.1 Herkunft des ANT	28
II.2.7.2 Bestimmung des ANT-Gehaltes in der ANT-Lösung	28
II.2.7.3 Bestimmung des Triton X-100-Gehaltes in der ANT-Lösung	29
II.2.7.4 Entfernung von überschüssigem Triton X-100 aus der ANT-Lösung	29
II.2.7.5 Humaner ANT-Autoantikörper-ELISA	30
II.2.8 Ermittlung der hämodynamischen Daten der Tierherzen	33
II.2.8.1 Vorbereitung der Tiere	33
II.2.8.2 Versuchsanordnung und Auswahl der Parameter	33
II.2.9 Quantitative Bestimmung der humanen Interleukine 6 und 8	34
II.2.10 Quantitative Bestimmung des humanen löslichen Interleukin 2-Rezeptors (sIL-2-R)	36

II.2.11 Immunhistologie	36
II.2.12 Gewichtsbestimmung der Mäuseherzen	38
II.2.13 Statistische Auswertung der Ergebnisse	39
III. Ergebnisse	40
III.1 Screening der kranken und gesunden Spender	41
III.2 Mortalität in den Mäusen nach dem Transfer von humanen PBL's	46
III.3 Humorale Parameter in der SCID-hu-PBL-Maus	46
III.3.1 Humanes IgM und IgG im Serum der SCID-Maus	48
III.3.2 Humane Interleukine 6 und 8 und humaner löslicher Interleukin-2-Rezeptor (s-IL-2-R) im Serum der SCID-Maus	50
III.3.3 Humane Autoantikörper gegen den ANT im Serum der SCID-Maus	52
III.4 Humane Lymphozyten im peripheren Blut der SCID-Maus	54
III.5 Humane Lymphozyten und Immunglobuline im Myokard der SCID-Maus	59
III.6 Humane Lymphozyten und Immunglobuline in Milz, Skelettmuskel, Niere und Leber der SCID-Maus	65
III.7 Linksventrikuläre Haemodynamik der Mäuseherzen (Ventrikelfrequenzen, Ventrikeldrücke und Ventrikeldruckanstiegsgeschwindigkeiten)	72
III.8 Gewichte der Mäuseherzen	80
III.9 Korrelation der hämodynamischen Werte und der humanen lympho- zytären Infiltrate im Myokard mit anderen Parametern der SCID-Maus	83

IV. Diskussion	85
IV.1 Ausmaß der Rekonstitution nach dem Transfer von humanen Blutlymphozyten in SCID-Mäuse	85
IV.2 Transfer von Autoimmunphänomenen von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie in SCID-Mäuse	93
IV.3 Übertragung linksventrikulärer Pumpfunktionsstörungen von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie durch Transfer von peripheren Blutlymphozyten in SCID-Mäuse	103
IV.4 Die SCID-hu-PbL-Maus als Modell der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie	105
V. Abkürzungsverzeichnis	109
VI. Literaturverzeichnis	112
VII. Zusammenfassung	128