

## IV. Diskussion

### IV.1 Ausmaß der Rekonstitution nach dem Transfer von humanen Blutlymphozyten in SCID-Mäuse

Es konnte in den hier vorgelegten Untersuchungen gezeigt werden, daß periphere Blutlymphozyten von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie sowie von gesunden Patienten (Kontrollen) erfolgreich in immuninkompetente SCID-Mäuse transferiert werden können und dort längere Zeit überleben. 60 Tage nach dem Transfer konnten humanes IgM, humanes IgG, humanes Interleukin 6, humanes Interleukin 8 und löslicher Interleukin-2-Rezeptor im Serum der SCID-hu-PBL-Mäuse nachgewiesen werden. Desweiteren wurden im peripheren Blut und in der Milz der Mäuse humane Lymphozyten gefunden. Im Gegensatz zum Serum der Tiere, die mit peripheren Blutlymphozyten gesunder Kontrollen rekonstituiert worden waren, fanden sich in dem der Tiere, in die PBL's von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie injiziert worden waren, zusätzlich Antikörper gegen den Adenin-Nukleotid-Translokator, erhöhte Spiegel an humanem Interleukin 6, humanem Interleukin 8, löslichem Interleukin-2-Rezeptor und vermehrt humane lymphozytäre Infiltrate im Myokard. Die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dp/dt \max.$  war bei vergleichbaren Ventrikeldrücken und -frequenzen als ein wesentlicher Parameter, die die Kontraktilität der Mäuseherzen bestimmen <sup>(121)</sup>, bei den Tieren, die PBL's von erkrankten Spendern erhalten hatten, signifikant niedriger als bei den Tieren, denen PBL's von gesunden Spendern injiziert worden waren. Ferner konnte gezeigt werden, daß die Herzmassen der Mäuse durch den Transfer von PBL's an inflammatorischer Kardiomyopathie erkrankter Patienten zunehmen, nicht jedoch durch Transfer von PBL's gesunder Spender. Es konnte durch die vorgelegten Ergebnisse gezeigt werden, daß die von den erkrankten Patienten bekannten Autoimmunphänomene und linksventrikulären Funktionsstörungen durch Transfer ihrer PBL's in der SCID-Maus reproduziert werden können.

Bei den hier beschriebenen Experimenten wurden  $50 \times 10^6$  PBL's pro Maus transferiert. Diese Anzahl wurde in Anlehnung an bereits früher veröffentlichte

Studien gewählt, bei denen unter anderem PBL`s von Patienten mit SLE, PBC, RA, AITD und Myokarditis bzw. PBL`s von gesunden Spendern in SCID-Mäuse übertragen wurden <sup>(63;69-79)</sup>. Zwei dieser Arbeiten hatten das schlechte Überleben peripherer humaner Blutlymphozyten in der SCID-Maus bei geringer transferierter Zellzahl und damit verbunden eine Art „Schwellenwerteffekt“ beschrieben <sup>(63)</sup>; die Gründe dafür sind noch unklar. Vermutet wird einerseits eine Abstoßung der humanen Zellen durch das Restimmunsystem der SCID-Mäuse, hauptsächlich durch NK-Zellen <sup>(64)</sup>, andere neuere Arbeiten <sup>(62)</sup> stellen diese Vermutung wiederum in Frage und weisen Peritoneal-Makrophagen eine vorrangige Stellung bei der Elimination der humanen Zellen zu; das Auftreten der NK-Zellen unter den peritonealen Exsudat-Zellen (PEC) der Tiere konnte hier z.B. nicht mit der Akzeptanz der PBL`s korreliert werden.

In den ersten oben beschriebenen Versuchsreihen wurden pro Maus  $15 \times 10^6$  PBL`s transferiert. Dies hat den theoretischen Vorteil den Patienten weniger Blut abnehmen zu müssen, wenn man von durchschnittlich  $1 \times 10^6$  isolierten PBL`s/ml Blut ausgeht (so benötigt man 15 ml, um eine Maus zu rekonstituieren). Zusätzlich bietet es die Möglichkeit mit einer gegebenen Menge an isolierten PBL`s eine größere Anzahl an Tieren rekonstituieren zu können. Allgemein sind die Angaben bezüglich der untersuchten Parameter jedoch sehr uneinheitlich. So waren bei einer der genannten Studien (Myokarditis) humane PBL`s 60 Tage nach Transfer in der Peripherie nur bei 45% der Mäuse nachweisbar (bis 6% der PBMC), der Durchschnitt für humanes IgG betrug z.B. 912 µg/ml, die Prävalenz humaner ANT-spezifischer Autoantikörper im Serum der Tiere, denen PBL`s von erkrankten Spendern injiziert worden waren, betrug 60% (IgG-Autoantikörper) bzw. 40% (IgM-Autoantikörper) und Organmanifestationen konnten hier nicht demonstriert werden <sup>(77)</sup>. In einer anderen Studie <sup>(SLE;73)</sup> dagegen wurden bei gleicher transferierter Zellzahl ( $15 \times 10^6$ ) 8 Wochen nach Transfer im Durchschnitt 2012 mg humanes IgG/ml gemessen, humane PBL`s in der Peripherie fanden sich bei 100% der Tiere (bis 15% der PBMC), die Prävalenz hu-ANA-positiver Seren betrug 93% mit Titern bis 1:300 und Organmanifestationen an der Niere wurden in 43% der untersuchten Tiere gefunden. In der oben erstgenannten Studie <sup>(MC;77)</sup> konnte dann bei weiteren Versuchsreihen durch die Erhöhung der Anzahl der transferierten Zellen auf  $50 \times 10^6$  PBL`s/Maus das Ausmaß

der Rekonstitution mit den humanen Lymphozyten signifikant verbessert werden, sowohl für die untersuchten humoralen Parameter wie IgG-, IgM-, sIL-2-R- und humanen TNF- $\alpha$ -Spiegel als auch für die zellulären Parameter; die Prävalenz humaner Lymphozyten in der Peripherie stieg auf 87,5% (bis 10% der PBMC), die Prävalenz ANT-spezifischer Autoantikörper im Serum der Patientengruppe betrug 83% (IgG und IgM) und humane lymphozytäre Infiltrate waren in 87,5% der Mäuse nachweisbar. Die oben angeführten SLE-Studie <sup>(75)</sup> war vom Design her sehr ähnlich, jedoch fanden die Untersucher 6 Wochen nach Transfer im Durchschnitt nur 1400  $\mu$ g IgG/ml (1200 – 2430  $\mu$ g/ml), wobei bei der Angabe von 20 – 50 x 10<sup>6</sup> transferierten Zellen/Maus nicht weiter differenziert wurde zu welchem IgG-Spiegel welche Anzahl transferierter Zellen gehört. Interessanterweise wurde in derselben Untersuchung <sup>(75)</sup> bei sonst gleichen Bedingungen einem Teil der Tiere Trimethoprim/Sulfomethoxazol zusätzlich ins Trinkwasser gegeben, um das Risiko opportunistischer Infektionen zu vermindern, was aber zu einer signifikant verringerten Produktion von IgG führte; der Durchschnitt betrug hier nur noch 36  $\mu$ g IgG/ml (5- 1800  $\mu$ g/ml). Obwohl die Anzahl der Tiere in beiden Gruppen klein war (Gesamt n=10), lassen diese Ergebnisse die Vermutung zu, daß Trimethoprim/ Sulfamethoxazol entweder die Immunglobulinproduktion in mit humanen PBL`s rekonstituierten SCID-Mäusen direkt vermindert oder daß das Antibiotikum die Bakterienflora reduziert, die möglicherweise für eine Stimulation der übertragenen Zellen nötig ist. In der hier vorgestellten Arbeit wurde deshalb auf die Beimengung von antimikrobiellen Substanzen zum Trinkwasser der Tiere bewußt verzichtet.

Die Beobachtung anderer Autoren, daß ohne Vorbehandlung der Tiere vor Transfer mit anti-asialo GM1 (zur Depletion der SCID-Maus-NK-Zellen) oder mit Bestrahlung (3 Gray) eine zufriedenstellende Rekonstitution der Tiere (Durchschnitt der CD3<sup>+</sup>-Zellen in der Milz <5%) nicht gewährleistet wird <sup>(65)</sup>, konnte in der hier vorgelegten Arbeit nicht bestätigt werden.

In der ersten oben näher beschriebenen Myokarditis-Studie <sup>(77)</sup> ergaben sich im Hinblick auf die Verteilung der einzelnen IgG-Subklassen oder des  $\lambda/\kappa$ -Verhältnisses keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich der verschiedenen Anzahl übertragener Zellen pro Tier, in allen Gruppen enthielt die Mehrzahl der Seren polyklonales humanes IgG.

Ganz offensichtlich war bei den hier vorgestellten vorangehenden Versuchen die hohe Zellzahl von  $50 \times 10^6$  PBL`s/Maus erforderlich, um sowohl eine befriedigende Rekonstitution mit den transferierten PBL`s als auch eine gute Funktionalität und Interaktion der einzelnen Zelltypen untereinander zu erreichen.

Dies stellt insofern ein Problem dar, als daß man den Spendern eine große Menge Blut abnehmen muß (ca. 200 ml), um daraus eine ausreichende Menge an PBL`s für den Transfer in mehrere Tiere gewinnen zu können.

Sowohl humanes IgG als auch humanes IgM waren bei der hier vorgestellten Arbeit in allen Seren (bis auf eine Ausnahme für IgM bei den Mäusen, die PBL`s von gesunden Spendern bekommen hatten) 60 Tage nach dem Transfer von  $50 \times 10^6$  kompletten PBL`s nachweisbar, der Durchschnitt für IgG betrug 1765 mg/l und für IgM 428 mg/l bei den Tieren, die mit PBL`s von gesunden Spendern rekonstituiert worden waren bzw. für IgG 1745 mg/l und für IgM 1051 mg/l bei den Tieren, die mit PBL`s von erkrankten Spendern rekonstituiert worden waren. Für IgG und IgM bei den Seren der „Kontroll-PBLs“-Mäuse entsprachen diese Werte 16,3% bzw. 23,0 % vom Durchschnitt der Spender-Seren, bei den Seren der „Inf-KMP-PBLs“-Mäuse entsprachen diese Werte 17,0% bzw. 51,1% vom Durchschnitt der Spender-Seren. Die Schwankungen dabei waren sehr groß, selbst bei gleichem Spender. Das verdeutlicht die Variabilität der Rekonstitution, mögliche Ursachen sind die Abstoßung humaner Zellen in der SCID-Maus oder Unterschiede der Injektionsorte innerhalb der Peritonealhöhle. Bedacht werden sollte dabei aber auch, daß die Syntheserate der humanen Immunglobuline in der SCID-Maus, bedingt durch die im Vergleich zum Menschen wesentlich kürzere Halbwertszeit (für IgG: 12 vs. 21 Tage) und die damit verbundene höhere Abbaurate<sup>(66;67;68)</sup> bedeutend höher gewesen sein muß, als dies die Spiegel in den Tierseren vermuten lassen. Die Antigenpezifität der Immunglobuline ist unbekannt; vermutet werden kann, daß sie zumindest zum Teil gegen Antigene gerichtet sind, mit denen der Spender vor dem Transfer in Kontakt kam. Aufgrund der Tatsache, daß keine Immunglobuline übertragen wurden und außerdem ihre Halbwertszeiten in der SCID-Maus sehr kurz sind<sup>(66)</sup>, muß man schließen, daß die im Serum der SCID-hu-PBL-Maus nachgewiesenen humanen Immunglobuline von den transferierten PBL`s gebildet worden sind.

Bereits früher wurde schon in einer Arbeit über die Polyklonalität der humanen IgG-Ketten in der SCID-Maus berichtet, die gezeigt hatte, daß in jedem der getesteten Seren alle vier IgG-Subklassen nachweisbar waren <sup>(77)</sup> und daß der relative Anteil der einzelnen Subklassen am Gesamt-IgG meist den Spenderseren entsprach. Mit diesem Wissen über die Mengen und die Klonalität der humanen Immunglobuline in der SCID-Maus lassen sich auch über die humanen Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen Aussagen machen.

Zum ersten müssen diese funktionell intakt sein, um Immunglobuline überhaupt in so großer Menge produzieren zu können und zum zweiten müssen sie ebenfalls polyklonal sein, weil jeder Klon nur einen Isotyp bildet. Nach dem Transfer in die SCID-Maus überlebt also ein polyklonales Repertoire an funktionsfähigen B- bzw. Plasmazellen. Der Frage, ob die humanen Immunglobuline in der SCID-Maus durch in den Spendern bereits aktivierte Plasmazellen oder durch „non-primed“ B-Lymphozyten, die erst in der SCID-Maus T-Helferzell-abhängig aktiviert werden, wurde bereits durch Untersuchungen nachgegangen, bei denen nur Lymphozyten-Subpopulationen, insbesondere CD4<sup>+</sup>-depletierte PBL`s transferiert wurden. Bei den Tieren, die CD4<sup>+</sup>-depletierte PBL`s aus 50 x 10<sup>6</sup> kompletten PBL`s injiziert bekommen hatten, war humanes IgG um mehr als 90% vermindert und humanes IgM gar nicht mehr nachweisbar <sup>(77)</sup>.

Es wurden hier somit offensichtlich zwei Populationen an B-Lymphozyten übertragen; zum einen noch nicht aktivierte B-Zellen, die in der SCID-Maus CD4<sup>+</sup>-abhängig antigenspezifisch polyklonal stimuliert werden und IgG und IgM sezernieren und zum anderen bereits in den Spendern aktivierte Plasmazellen, die in der SCID-Maus CD4<sup>+</sup>-unabhängig spontan polyklonales IgG und möglicherweise IgM bilden <sup>(130)</sup>. Auch wenn bei den oben genannten Untersuchungen humanes IgM 60 Tage nach dem Transfer CD4<sup>+</sup>-depletierter Lymphozyten nicht mehr im Serum der SCID-hu-PBL-Maus nachweisbar war, kann es doch zu einem früheren Zeitpunkt durchaus gebildet worden sein und dem Nachweis dann aber, bedingt durch die kurze Halbwertszeit von nur 37 Stunden <sup>(68)</sup>, am Tag 60 durch die hohe Abbaurate entgangen sein.

Beim Vergleich der hier vorgestellten Ergebnisse mit Werten, die in anderen Untersuchungen unter identischen bzw. ähnlichen Transferbedingungen,

insbesondere bei gleicher transferierter Zellzahl, gefunden worden sind, zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Werte für humanes IgG <sup>(63;87;99)</sup>. Die Werte für humanes IgM werden dagegen deutlich niedriger angegeben <sup>(76;87)</sup>. Die kontrovers diskutierten Differenzen in der Literatur bezüglich der Klonalität der humanen Plasmazellen in der SCID-Maus könnten durch unterschiedliche Rekonstitution mit Makrophagen oder T-Helferzellen bedingt sein, zweier Zellpopulationen, die die Synthese humaner Immunglobuline maßgeblich beeinflussen.

Humane Lymphozyten im peripheren Blut der SCID-Mäuse 60 Tage nach Transfer konnten bis auf wenige Ausnahmen in der hier vorgestellten Arbeit reproduzierbar nachgewiesen werden. Die Prävalenz betrug bei den untersuchten Tieren, die mit PBL`s von gesunden Spender rekonstituiert worden waren, für T-Lymphozyten 100% (bis 12,67 % der PBMC) und für B-Lymphozyten 55,6% (bis 1,52% der PBMC) und bei den untersuchten Tieren, die mit PBL`s von erkrankten Spendern rekonstituiert worden waren, für T-Lymphozyten 85,7% (bis 22,2% der PBMC) und für B-Lymphozyten 76,2% (bis 4,2% der PBMC). Insgesamt betrug die Prävalenz im peripheren Blut für humane T-Zellen somit 92,5% und für humane B-Zellen 70,0%.

Bei den T-Zellen war der Anteil der CD8<sup>+</sup>-Zellen etwas größer als der der CD4<sup>+</sup>-Zellen. Signifikante Unterschiede bezüglich des prozentualen Anteils der einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen an den humanen Zellen gab es zwischen den Patientengruppen nicht. Diese Untersuchungen zeigen, daß es nach intra-peritonealer Injektion der humanen kompletten PBL`s in die SCID-Mäuse in der Mehrzahl der Tiere zu einer Migration und zu einer systemischen Ausschwemmung der transferierten humanen Lymphozyten über den Blutweg kommt. Die humanen Zellen können so jedes vaskularisierte Gewebe der SCID-Maus erreichen und als zirkulierende Zellen alle wirtsspezifischen Antigene erkennen. Durch die lokale Injektion der hohen Zellzahl von  $50 \times 10^6$  PBL`s pro Tier in die Peritonealhöhle kam es bis auf wenige Ausnahmen zu einer systemischen Rekonstitution der SCID-Mäuse mit den transferierten T- und B-Lymphozyten. Humane Makrophagen, antigen-präsentierende Zellen also, konnten dagegen im peripheren Blut der transfundierten SCID-Mäuse nicht nachgewiesen werden, über ihre systemische Ausschwemmung ist folglich nichts bekannt.

Beim differentiellen Transfer von einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen, sowohl von CD4<sup>+</sup>-depletierten PBL`s wie auch von CD4<sup>+</sup>-Zellen, konnten bei anderen Untersuchungen humane Lymphozyten in der Peripherie der SCID-Maus nicht reproduzierbar nachgewiesen werden <sup>(77)</sup>; vermutlich kommt es durch die gestörte Interaktion der einzelnen Zelltypen zu keiner meßbaren Ausschüttung von humanen Lymphozyten in das periphere Blut der Tiere. Eine systemische Rekonstitution mit transferierten humanen Lymphozyten-Subpopulationen konnte also in diesen vorangegangenen Untersuchungen nicht erreicht werden.

Die hier diskutierten Werte für die Prävalenz humaner Zellen in der Peripherie der SCID-Maus nach Transfer stimmen mit anderen Untersuchungen überein <sup>(72;88;99)</sup>, der von einzelnen Autoren beschriebene Anteil der humanen Zellen von bis zu 40% der mononukleären Zellen <sup>(72)</sup> konnte jedoch durch die hier vorgestellten Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Konnten auch die transferierten humanen Makrophagen nicht direkt nachgewiesen werden, so wurde doch bereits in der Literatur über den Nachweis eines ihrer Sekretionsprodukte im Serum der SCID-Maus berichtet, nämlich über den humanen Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ . Dieses Zytokin wird zwar nicht streng spezifisch von Makrophagen gebildet, dennoch sind aktivierte Makrophagen bei weitem die Hauptproduzenten des TNF- $\alpha$  <sup>(89;94)</sup>.

Humaner TNF- $\alpha$  konnte dort ebenfalls nur nach dem Transfer von  $50 \times 10^6$  kompletten PBL`s (dann aber bei allen Tieren) reproduzierbar im Serum der SCID-hu-PBL-Maus nachgewiesen werden, nicht jedoch nach dem Transfer von  $15 \times 10^6$  PBL`s oder dem Transfer von Lymphozyten-Subpopulationen aus  $50 \times 10^6$  PBL`s. Keine Unterschiede ergaben sich bezüglich der Quelle der transferierten PBL`s („Gesund“ vs. „Erkrankt“). Diese Ergebnisse zeigen, daß bei den zitierten Untersuchungen eine hohe Anzahl an transferierten PBL`s erforderlich war, damit eine ausreichende Anzahl an aktivierten und funktionell intakten (= Zytokine-sezernierenden), Antigen-präsentierenden Zellen überlebt. Durch die Antigen-Präsentation in Verbindung mit dem TNF- $\alpha$  als zweitem Signal sind die formellen Voraussetzungen einer Aktivierung der humanen T-Lymphozyten in der SCID-Maus gegeben. Mit der Bestimmung des humanen TNF- $\alpha$  im Serum der SCID-Maus ist

aber, wie auch bei den Immunglobulinen, keine Aussage über den Ort der humanen Makrophagen-Aktivierung in der SCID-Maus möglich.

60 Tage nach Transfer konnten humane T-Lymphozyten in der Milz der SCID-hu-PBL-Maus nachgewiesen werden; dabei konnten humane Zellen in den Milzen auch dann nachgewiesen werden, wenn in der Peripherie keine humanen Zellen demonstrierbar waren. Diese Ergebnisse zeigen, daß es zum einen zu einer Migration der intraperitoneal injizierten Lymphozyten in die Milz gekommen ist und daß zum zweiten die Milz als eine Art „Speicher“ mit günstigem Mikroklima für die humanen Lymphozyten wirkt, von wo aus dann die Ausschüttung in die Peripherie erfolgt. Es ist bisher nichts über die genauen Mechanismen des „Homing“ und der dafür verantwortlichen Rezeptoren bekannt <sup>(66)</sup>. Auch von anderen Untersuchern wurden humane T- und B-Lymphozyten in der Milz der SCID-hu-PBL-Maus bei vergleichbaren Transferbedingungen beschrieben <sup>(68;90)</sup> und auch erfolgreich kultiviert <sup>(64;90)</sup>, d.h. es wurde gezeigt, daß die humanen T-Lymphozyten aus der Milz auch 60 Tage nach Transfer polyklonal proliferationsfähig und damit funktionell intakt waren. Andere Untersucher <sup>(91;92)</sup> dagegen fanden keine humanen Zellpopulationen in der Milz der SCID-hu-PBL-Maus, diese Experimente wurden allerdings mit „leaky“-Tieren <sup>(92)</sup> bzw. mit geringerer Zellzahl <sup>(91)</sup> durchgeführt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß verschiedene Funktionen eines normalen humanen Immunsystems in SCID-Mäuse übertragen wurden und entsprechende Parameter nachgewiesen werden konnten, was im Hinblick auf die Interpretation der transferierten Autoimmunphänomene wichtig erscheint.

## **IV.2 Transfer von Autoimmunphänomenen von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie in SCID-Mäuse**

Mit den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß die von den Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie bekannten Autoimmunphänomene durch den Transfer ihrer PBL`s in SCID-Mäusen reproduziert werden können. Im Serum von Mäusen, die mit PBL`s von erkrankten Spendern rekonstituiert wurden, ließen sich so im Gegensatz zu den Tieren, in die PBL`s von gesunden Spendern übertragen wurden, humane ANT-spezifische Autoantikörper, erhöhte Spiegel an humanem Interleukin-6, humanem Interleukin-8 und humanem Interleukin-2-Rezeptor nachweisen. Weiterhin wiesen diese Tiere, die mit PBL`s von erkrankten Spendern rekonstituiert wurden, vermehrt humane lymphozytäre Infiltrate im Myokard auf.

Es wurden für den Transfer ihrer PBL`s in SCID-Mäuse Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie ausgesucht, die als Zeichen einer gegen Herzmuskelstrukturen ablaufenden Autoimmunreaktion hohe Titer ANT-spezifischer Autoantikörper im Serum aufwiesen. In vorangegangenen Untersuchungen konnte der ANT als ein hauptsächliches Autoantigen identifiziert werden, welches von Autoantikörpern im Serum eines signifikanten Prozentsatzes von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie erkannt wird <sup>(48;49)</sup>. Diese ANT-spezifischen Autoantikörper konnten im Serum der Patienten und 60 Tage nach Transfer mehrheitlich im Serum der SCID-Mäuser nachgewiesen werden, die PBL`s von erkrankten Spendern erhalten hatten. Es muß somit eine anhaltende Immunreaktion gegen den ANT als Ursache der Autoantikörperbildung angenommen werden, da diese Autoantikörper in den Seren der gesunden Spender sowie in den SCID-Mäusen, die PBL`s von gesunden Spendern injiziert bekommen hatten, fehlten. Diese humorale Autoimmunreaktion in den Patienten läßt sich durch die Übertragung ihrer PBL`s in SCID-Mäuse transferieren, und der ANT kann in der SCID-Maus wiederum als „Target“ dieser humanen Autoantikörper demonstriert werden. In einer vorangehenden Untersuchung <sup>(77)</sup> konnte bereits beim differentiellen Transfer von Lymphozyten-Subpopulationen aus  $50 \times 10^6$  PBL`s gezeigt werden, daß humane Autoantikörper der Klasse IgM in der SCID-Maus dort vollständig T-Helferzell-

abhängig gebildet werden. Die Bildung humaner IgM-Autoantikörper in der SCID-Maus erforderte also eine Interaktion zwischen T- und B-Lymphozyten. Dagegen wurden die humanen Autoantikörper der Klasse IgG in der SCID-Maus offensichtlich T-Helferzell-unabhängig, das heißt von bereits in den Patienten aktivierten und in der SCID-Maus spontan sezernierenden autoreaktiven Plasmazellen gebildet<sup>(130)</sup>. Im Ganzen handelt es sich also bei den Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie um eine in der SCID-Maus reproduzierbare und weiterlaufende humorale Autoimmunreaktion gegen den ANT.

In anderen Arbeiten konnten nach dem Transfer von PBL's von Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie der Primär biliären Zirrhose, der Rheumatoiden Arthritis, dem M. Basedow und dem Systemischen Lupus Erythematodes in SCID-Mäuse ebenfalls humane Autoantikörper im Serum der Tiere nachgewiesen werden, wie Tabelle 20 zeigt.

Mehrere vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, daß neben zahlreichen anderen Zytokinen dem Interleukin-6 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, insbesondere der Autoimmunerkrankungen, zukommt<sup>(52;54;58;118)</sup>. Bei den Autoimmunerkrankungen wurde die Rolle des IL-6 bisher vor allem bei der Rheumatoiden Arthritis untersucht<sup>(81;82)</sup>. Matsuno et al. konnten zeigen, daß die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen den Interleukin-6-Rezeptor bei SCID-Mäusen, die zuvor mit PBMC's von Patienten mit rheumatoider Arthritis rekonstituiert worden waren, zu einem deutlichen Rückgang des Auftretens inflammatorischer Zellen und histologisch erkennbarer Manifestationen der RA in den humanen transplantierten synovialen Geweben führt<sup>(83)</sup>. Oppenheim et al. fanden eine direkte Korrelation zwischen der Konzentration des IL-6 in Serum und Gelenkflüssigkeit und Schwere der klinischen Manifestationen der rheumatoiden Arthritis bei Ihren Patienten<sup>(84)</sup>. Coccia et al. konnten zeigen, daß die zeitgleiche Injektion von rekombinantem humanem IL-6 und peripheren Blutlymphozyten gesunder Spender in SCID-Mäuse die Rekonstitution der Tiere mit den humanen Zellen sowohl quantitativ als auch qualitativ signifikant verbessert und deren Aktivierung deutlich erhöht<sup>(80)</sup>.

IL-6 induziert die Aktivierung und Proliferation von B-Lymphozyten und deren Differenzierung bzw. Reifung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen<sup>(50)</sup>, die

**Tabelle 20:** Ergebnisse aus bisher veröffentlichten Studien, in denen ausschließlich periphere Blutlymphozyten (PBL`s) von Patienten mit Autoimmunerkrankungen in SCID-Mäuse übertragen wurden. Neben dem Design der Studien sind einige Einzelheiten über die Bildung humaner Autoantikörper in der SCID-hu-PBL-Maus wie Antigen-Spezifität der Autoantikörper und Prävalenzen aufgeführt.

Quelle	Erkrankung	n Patienten	n SCID-Maus	Zellzahl/Maus	Tage post Transfer	Prävalenz humaner Auto-AK	Antigen-Spezifität
(69)	AITD	5	22	10-25x10 <sup>6</sup>	21	50%	Tg,TPO
(70)	AITD	13	15	10-30x10 <sup>6</sup>	60	63%	Tg,TPO
(71)	AITD	4	14	10x10 <sup>6</sup>	66	50%	TPO
(72)	AITD	6	28	10-40x10 <sup>6</sup>	28	24%	Tg,TPO
(73)	SLE	5	15	15x10 <sup>6</sup>	60	93%	DNA (ANA)
(74)	SLE			50x10 <sup>6</sup>			anti-Ro
(75)	SLE	16	16	20-50x10 <sup>6</sup>	42	50%	DNA,RNP Ro/SSA,La
(76)	RA	8	19	20-50x10 <sup>6</sup>	49	43%	IgG(RF) DNA
(77)	MC	5	15	15-50x10 <sup>6</sup>	60	83%	ANT
(78)	PBC	6	10	10-42x10 <sup>6</sup>	56	100%	AMA (PDH)
(79)	PBC	4	82	20x10 <sup>6</sup>	30	100%	AMA (α-M2Ab)

Produktion von Interleukin-2 und die Expression des Interleukin-2-Rezeptors in T-Lymphozyten<sup>(51)</sup> sowie Proliferation und Differenzierung der T-Zellen<sup>(52;53;54)</sup>, ferner beschleunigt es die Differenzierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen und induziert die Produktion von Akute-Phase-Proteinen<sup>(57;58)</sup>.

Interleukin-6 konnte im Serum aller Spender nachgewiesen werden; die IL-6-Spiegel der erkrankten Spender waren im Durchschnitt fast dreimal so hoch wie die der gesunden Spender (22,2 pg/ml vs. 7,9 pg/ml). Bei den SCID-Mäusen lag die Prävalenz der positiven Seren für beide Tiergruppen zusammen bei 82%, ohne Unterschiede bezüglich der Herkunft der übertragenen Zellen. Die IL-6-Spiegel im Serum waren im Durchschnitt bei den Tieren, die mit PBL`s von erkrankten Spendern rekonstituiert worden waren, allerdings doppelt so hoch wie die der Mäuse, die mit PBL`s von gesunden Spendern rekonstituiert worden waren (8,38 pg/ml vs. 4,27 pg/ml). Diese Unterschiede sind statistisch signifikant. Dies bedeutet einerseits, daß die humanen B- und T-Zellen der erkrankten Spender schon vor Transfer deutlich stärker aktiviert waren als die der gesunden Spender und andererseits, daß die transferierten humanen B- und T-Zellen der erkrankten Spender in den SCID-Mäusen zum Zeitpunkt 60 Tage post Transfer noch immer oder wieder deutlich stärker aktiviert gewesen sind als die transferierten Zellen der gesunden Spender zum gleichen Zeitpunkt. Die im Durchschnitt deutlich höheren IgM-Konzentrationen in den Tieren, in die PBL`s der erkrankten Spender transferiert worden waren, im Vergleich zu denen, die mit PBL`s gesunder Spender rekonstituiert wurden (1051 mg/l vs. 428 mg/l), bestätigen diese Beobachtungen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die von den erkrankten Spendern bekannte erhöhte B- und T-Zell-Aktivierung als Zeichen einer Autoimmunreaktion auch in der SCID-Maus nach dem Transfer ihrer PBL`s von demonstrieren läßt (siehe auch sIL-2-R).

Aktivierte T-Lymphozyten produzieren sowohl IL-2 als auch spezifische hochaffine Rezeptoren auf der Zelloberfläche für diesen Wachstumsfaktor, die bei ruhenden Zellen fehlen. Der humane Interleukin-2-Rezeptor besteht aus zwei Polypeptidketten, der  $\alpha$ -Kette, p55 oder auch Tac genannt, und der  $\beta$ -Kette, auch p70 genannt. Die Kombination beider Ketten bildet den hochaffinen IL-2-Rezeptor, der für die Internalisation und damit die Wirkung von Interleukin-2 auf die Zielzelle

verantwortlich ist. Bei der Bindung von Interleukin-2 an den Rezeptor wird das Zytokin über die b-Kette in das Zellinnere geschleust, wobei gleichzeitig die a-Kette als lösliches Polypeptid (sIL-2-R) in den Extrazellulärraum abgegeben wird <sup>(61)</sup>. Die ins Serum abgegebene Menge an sIL-2-R ist dabei der aufgenommenen Menge an Interleukin-2 und folglich auch dem Grad der T-Zell-Aktivierung proportional <sup>(85;59)</sup>. Die Bestimmung der sIL-2-Konzentration im Serum kann also dazu benutzt werden, um den Grad der T-Zell-Aktivierung in Patienten bei verschiedenen Erkrankungen zu untersuchen. Bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen wurde bereits über erhöhte Spiegel an sIL-2-R in der Literatur berichtet <sup>(85;59)</sup>. Auch bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie bzw. inflammatorischer Kardiomyopathie wurden erhöhte Werte für den sIL-2-R gefunden <sup>(86;77)</sup>.

In den Seren von sechs der neun erkrankten Spender (Spender A,C,E,G,H und I), deren PBL`s in SCID-Mäuse transferiert wurden, konnten als Zeichen einer gesteigerten T-Lymphozyten-Aktivierung sIL-2-R-Spiegel von mehr als 100 pmol/l (Obergrenze des Normbereichs) nachgewiesen werden. Drei der vier gesunden Spender, deren PBL`s in SCID-Mäuse transferiert worden waren, wiesen dagegen normale Serumspiegel an sIL-2-R auf. 60 Tage nach dem Transfer von  $50 \times 10^6$  kompletten PBL`s zeigten die Mäuse, die mit PBL`s von an inflammatorischer Kardiomyopathie erkrankten Spendern rekonstituiert worden waren, statistisch signifikant höhere Spiegel an humanem sIL-2-R im Vergleich zu den Tieren, die PBL`s von gesunden Spendern erhalten hatten (112,4 pmol/l vs. 27,3 pmol/l). Dies bedeutet, daß die transferierten T-Lymphozyten der erkrankten Spender in der SCID-Maus deutlich stärker antigen-spezifisch aktiviert waren als die übertragenen humanen T-Lymphozyten der gesunden Spender. Auch diese Beobachtungen zeigen wiederum, daß sich die von den erkrankten Spendern bekannte erhöhte T-Zell-Aktivierung als Zeichen einer Autoimmunreaktion in der SCID-Maus nach dem Transfer der PBL`s der erkrankten Spender demonstrieren läßt.

Interleukin-8 wird hauptsächlich von Monozyten bzw. Makrophagen, T-Lymphozyten, Endothelzellen und ferner Fibroblasten gebildet <sup>(51;60;95)</sup>. IL-8 ist ebenso ein wesentliches Chemotaktikum für oben genannte Monozyten/Makrophagen und

T-Lymphozyten, bei letzteren sowohl für stimulierte als auch unstimulierte Zellen <sup>(51)</sup>; die lokale Injektion von rekombinantem IL-8 in verschiedene Gewebe führt bei Ratten, Hamstern und Mäusen zu lokaler Infiltration von T-Lymphozyten <sup>(60)</sup>. Humane T-Lymphozyten -sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup>- reagieren bezüglich der chemotaktischen Antwort ca. 10-fach sensitiver als andere Leukozyten <sup>(60)</sup>. IL-8 verstärkt die Adhärenz von Monozyten zu Endothelien und führt bei Ratten abhängig von der Anwesenheit anderer nicht näher beschriebener Leukozyten zu einer vermehrten Gefäßpermeabilität <sup>(60)</sup>. Gut untersucht ist die chemotaktische Wirkung des IL-8 auf Entzündungszellen in synovialen Geweben bei der Rheumatoiden Arthritis <sup>(93;94)</sup>. Interleukin-8 ließ sich im Serum von acht der neun erkrankten Spender und im Serum von drei der vier gesunden Spender nachweisen. Dabei waren die Werte bei den erkrankten Spendern allerdings mehr als dreimal so hoch wie die Serumspiegel bei den gesunden Spendern (89,4 pg/ml vs. 26,2 pg/ml). 60 Tage nach dem Transfer von  $50 \times 10^6$  kompletten PBL´s zeigten die Mäuse, die mit Zellen der an inflammatorischer Kardiomyopathie erkrankten Spender rekonstituiert wurden, höhere Spiegel an humanem IL-8 im Vergleich zu den Tieren, die Zellen von gesunden Spendern injiziert bekommen hatten. Dies läßt darauf schließen, daß sowohl bei den erkrankten Spendern als auch bei den mit PBL´s von erkrankten Spendern rekonstituierten Mäusen 60 Tage nach Transfer die humanen Monozyten/Makrophagen und vor allem die T-Zellen stärker chemotaktisch aktiviert gewesen sind als die entsprechenden Zellen der gesunden Spender bzw. als die von gesunden Spendern stammenden Zellen in den SCID-Mäusen. Diese Beobachtungen sind interessant bei der Frage nach den humoralen und zellulären Mechanismen, die für die Entstehung der hier nachgewiesenen deutlich verstärkten zellulären Infiltrate im Myokard der Mäuse verantwortlich sind, die mit PBL´s von erkrankten Spendern rekonstituiert wurden im Gegensatz zu den Mäusen, die PBL´s von gesunden Spendern injiziert bekommen hatten. Ein Vergleich mit anderen Untersuchungen ist für das humane Interleukin-8 in der SCID-Maus nicht möglich, da es bislang keine Angaben in der Literatur zu diesem Thema gibt.

Bereits in einer vorangegangenen Untersuchung <sup>(77)</sup> konnte gezeigt werden, daß der Transfer von CD4<sup>+</sup>-depletierten Lymphozyten aus 50 x 10<sup>6</sup> kompletten PBL's zu statistisch signifikant verminderten Werten für den sIL-2-R führt und somit zeigt, daß die T-Zell-Aktivierung in der SCID-Maus und somit auch indirekt in den Patienten in Abhängigkeit von CD4<sup>+</sup>-positiven T-Helferzellen erfolgt. Insgesamt handelt es sich also bei den an inflammatorischer Kardiomyopathie erkrankten Spendern um eine in der SCID-Maus reproduzierbare und persistierende, CD4<sup>+</sup>-abhängige zelluläre Autoimmunreaktion.

Das dafür verantwortliche Antigen ist unbekannt, der ANT stellt jedoch ein mögliches „Target“ der T-Lymphozyten dar. Eine ausschließliche Aktivierung der Patienten-T-Lymphozyten in der SCID-Maus durch unterschiedliche MHC-Antigene zwischen den humanen und murinen Zellen erscheint unwahrscheinlich, da man für eine solche Graft-versus-Host-(GVH)-Reaktion gleiche oder zumindest vergleichbare Werte des sIL-2-R in allen rekonstituierten Mäusen annehmen müßte, unabhängig von der Herkunft der transferierten PBL's (erkrankte vs. gesunde Spender). Eine subklinische GVH-Reaktion ist also nicht mit Sicherheit auszuschließen, sie kann aber die gefundenen Unterschiede zwischen den Mäusen, die Kontroll-PBLs und denen, die Inf-KMP-PBLs erhalten hatten, nicht erklären.

Bei den neun an inflammatorischer Kardiomyopathie erkrankten Spendern lag in den immunhistochemisch aufgearbeiteten Endomyokard-Biopsien ein zelluläres und lymphozytäres Infiltrat im Interstitium des Myokards als Zeichen einer Entzündungsreaktion im Herzmuskel vor. 60 Tage nach Transfer der 50 x 10<sup>6</sup> kompletten PBL's konnten bis auf eine Ausnahme in allen untersuchten Herzen der Mäuse humane infiltrierende T-Lymphozyten nachgewiesen werden, sowohl in den SCID-hu-„Kontroll-PBLs“-Mäusen als auch in den SCID-hu-„Inf-KMP-PBLs“-Mäusen. Die Anzahl der infiltrierenden T-Lymphozyten war allerdings bei den Mäusen, die mit PBL's von erkrankten Spendern rekonstituiert worden waren, um ein Mehrfaches höher und nur bei diesen Tieren war als charakteristisches Zeichen einer Herzmuskelentzündung eine fokale Nestbildung zu beobachten. Die Organspezifität dieser Infiltrate wurde durch den fehlenden Nachweis solcher Infiltrate in der

entsprechenden Größenordnung in anderen Organen, insbesondere dem Skelettmuskel, demonstriert.

Diese Ergebnisse belegen, daß die von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie bekannten lymphozytären Infiltrate im Myokard durch den Transfer ihrer PBL's in der SCID-Maus reproduziert werden können. Die statistisch signifikante Korrelation mit humanem Interleukin-6 ( $p < 0,05$ ) und dem humanen solublen Interleukin-2-Rezeptor ( $p < 0,05$ ) im Serum der SCID-hu-PBL-Maus belegt, daß die Infiltrate nur bei aktivierten, proliferierenden, zur Differenzierung angeregten und funktionell intakten humanen T- und B-Lymphozyten vorkommen, was gegen eine „zufällige“ Ansammlung humaner Zellen im Myokard der Tiere spricht. Diese Ergebnisse und das Fehlen dieser Infiltrate beim differentiellen Transfer von Lymphozyten-Subpopulationen zeigen, daß sowohl humorale als auch zelluläre Mechanismen an der Entstehung solcher Infiltrate -und damit auch an der Pathogenese der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie- beteiligt sind <sup>(146)</sup>. Weiterhin sind die humanen lymphozytären Infiltrate im Myokard der SCID-Maus signifikant mit humanen ANT-spezifischen IgG-Autoantikörpern korreliert ( $p < 0,025$ ), wie dies auch schon für humane ANT-spezifische IgM-Autoantikörper gezeigt werden konnte <sup>(77)</sup>, was die für die Genese der Infiltrate erforderliche B-T-Lymphozyten-interaktion ebenfalls verdeutlicht. Es bestand allerdings keine direkte lineare Abhängigkeit zwischen der Menge an humanen lymphozytären Infiltraten im Myokard und der Höhe der humoralen Parameter im Serum der SCID-hu-PBL-Maus. Dies läßt auf das Vorhandensein von weiteren und bislang unbekanntem, möglicherweise im Myokard lokalisierten Faktoren schließen.

Die Antigen-Spezifität der infiltrierenden humanen T-Lymphozyten im Myokard der SCID-Maus ist unbekannt, der ANT stellt jedoch ein mögliches „Target“ der infiltrierenden Lymphozyten dar. Verschiedene Hinweise deuten darauf hin, daß diese Infiltrate Myokarditis-bezogen sind und nicht in Zusammenhang mit einer Graft-versus-Host-Erkrankung stehen. Es sprechen gegen eine GVHD zum ersten, daß alle -bis auf eine Ausnahme- rekonstituierten Mäuse den Transfer 60 Tage ohne klinische Zeichen einer GVHD überlebten, wobei aber eine akute xenogene GVHD in der SCID-Maus mit einer hohen Morbidität (60 - 100%) sowie Mortalität (50 - 100%) assoziiert ist <sup>(47;96)</sup>. Zum zweiten waren die humanen lymphozytären Infiltrate

herzmuskelspezifisch und fehlten in anderen Organen, wohingegen eine chronische GVHD typischerweise systemisch verläuft <sup>(46;97;64)</sup>. Zum dritten wurden ausschließlich „non-leaky“-SCID-Mäuse verwendet, wohingegen eine GVHD meist beim Transfer in „leaky“-Tiere beobachtet wurde <sup>(63)</sup>.

Letztendlich ist wissenschaftlich der Mechanismus nicht geklärt, wie humane T-Lymphozyten im Myokard der SCID-Maus bei gleichzeitig fehlendem Nachweis humaner Makrophagen im peripheren Blut in vivo murine Herzmuskel-Antigene erkennen können. Andererseits haben in-vitro-Untersuchungen aber gezeigt, daß humane CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten auch ohne Makrophagen als Antigen-präsentierende Zellen Maus-Antigene direkt erkennen und gegen sie spezifisch proliferieren können, wenn Interleukin-1 oder -2 zugegeben wird <sup>(98;45)</sup>. Aus dieser Beobachtung heraus schließen die Autoren, daß zum einen die Makrophagen ihre Wirkung auf die T-Lymphozyten bei der Erkennung von Maus-Antigenen nicht allein über Antigen-Prozessierung, sondern auch über die Sekretion von Zytokinen vermitteln und daß zum anderen das humane T-Zell-Repertoire auch solche Rezeptoren umfaßt, die die direkte Erkennung von Maus-Antigenen erlauben. In der Literatur wird die Reproduktion krankheitsspezifischer Organveränderungen in der SCID-Maus nach dem Transfer von PBL´s aus Patienten mit Autoimmunerkrankungen recht unterschiedlich beurteilt. Krams et al. fanden für die primär biliäre Zirrhose typische Veränderungen in den Portalfeldern der Leber von SCID-Mäusen, die mit PBL´s von Patienten mit PBC rekonstituiert worden waren <sup>(78)</sup>, Abedi et al. dagegen konnten bei ähnlichem Studiendesign diese Veränderungen bei ihren Untersuchungen nicht demonstrieren, hierbei wurden allerdings nur  $20 \times 10^6$  PBL´s pro Maus übertragen <sup>(79)</sup>. Duchosal et al. berichteten über SLE-typische Veränderungen in der Niere der SCID-Mäuse, die PBL´s von Patienten mit SLE erhalten hatten <sup>(73)</sup>, bei Ashany et al. dagegen waren bei nahezu gleichem Studiendesign solche Veränderungen wiederum nicht nachweisbar <sup>(75)</sup>. Humane entzündliche Infiltrate in der Schilddrüse (nach Transfer von PBL´s aus Patienten mit M. Basedow) oder in den Gelenken (nach Transfer von PBL´s aus Patienten mit rheumatoider Arthritis) der SCID-hu-PBL-Maus wurden bislang nicht beschrieben <sup>(69;70;71;72;76)</sup>. Allerdings waren in den bisherigen Studien die Zahl der untersuchten Patienten bzw.

SCID-Mäuse zu gering (siehe Tabelle) und die Transferbedingungen zu unterschiedlich, um die Reproduktion krankheitsspezifischer Organveränderungen in der SCID-Maus nach dem Transfer von PBL´s aus Patienten mit Autoimmunerkrankungen zuverlässig beurteilen zu können. Bei einzelnen der erwähnten Studien wurde offensichtlich auch nicht nach Organveränderungen gesucht, zumindest wird von den Autoren nicht über eine entsprechende Suche berichtet <sup>(74)</sup>. Der Schwerpunkt bisheriger Untersuchungen liegt bezüglich der Frage nach reproduzierbaren Autoimmunphänomenen bei humoralen Parametern. Zur Klärung dieser zentralen Frage nach der Reproduzierbarkeit krankheits-spezifischer Organveränderungen sind weitere Studien nötig, um die SCID-hu-PBL-Maus als Modell humaner Autoimmunität zu etablieren. Bislang ist das Auftreten humaner lymphozytärer Infiltrate im Myokard der SCID-hu-PBL-Maus in der Literatur von anderen Arbeitsgruppen noch nicht beschrieben worden. In der bisher einzigen Studie anderer Untersucher dazu <sup>(68)</sup> konnten in keinem der untersuchten Herzen humane Leukozyten nach Übertragung von PBLs gesunder Spender nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnten durch den Transfer von peripheren Blutlymphozyten aus Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie in SCID-Mäuse die von den Patienten bekannten Autoimmunphänomene, wie das Auftreten ANT-spezifischer Autoantikörper, erhöhte Serumspiegel an humanem IL-6, humanem sIL-2-Rezeptor, humanem IL-8 und infiltrierende lymphozytäre Infiltrate im Myokard, in die SCID-hu-PBL-Mäuse übertragen werden. Die SCID-Maus stellt also ein geeignetes Modell dar, um die Autoimmunpathogenese der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie in vivo zu untersuchen.

### **IV.3 Übertragung linksventrikulärer Pumpfunktionsstörungen von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie durch Transfer von Blut-Lymphozyten in SCID-Mäuse**

Das Messen von rechts- und linksventrikulären haemodynamischen Parametern findet in der Klinik breite Anwendung, um systolische und diastolische Funktionen des Herzens bei den verschiedensten Krankheitsbildern untersuchen und beurteilen zu können. Bei den invasiven Verfahren (Herzkatheter) gehören dazu vor allem die Bestimmung der Druckverläufe im rechten und linken Herzen, des Herzminutenvolumens (Thermodilution) und der Herzvolumina (LV- bzw. RV-Angiographie). Daraus ergeben sich folgende wesentliche Parameter: die links- bzw. rechtsventrikulären enddiastolischen bzw. -systolischen Drücke (LVEDP; RVEDP u.s.w.) und Volumina, die isovolumetrischen Relaxationszeiten, die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt \text{ max.}$ ), die Ejektionsfraktion (EF) und der Herzindex (CI, in  $l/\text{min}/\text{m}^2$  Körperoberfläche). Wichtige Parameter zur Abschätzung der linksventrikulären systolischen Funktion sind hierbei EF und CI, sowie  $dp/dt \text{ max.}$ , wobei letzterem als Maß der Kontraktilität des linken Ventrikels eine besondere Bedeutung zukommt <sup>(121)</sup>.

Zu den sensibelsten bei der inflammatorischen Kardiomyopathie zu beobachtenden Änderungen hämodynamischer Parameter gehören das Ansteigen der enddiastolischen Drücke und die Reduktion der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeiten <sup>(23;115;116;121;137)</sup>.

Um die Frage beantworten zu können, ob sich die von den an Inf-KMP erkrankten Patienten bekannten kardialen Funktionseinschränkungen durch den Transfer Ihrer PBLs in SCID-Mäuse bei den Tieren reproduzieren lassen, wurden 60 Tage nach Transfer von  $50 \times 10^6$  PBLs / Tier von Patienten mit Inf-KMP bzw. von gesunden Spendern in SCID-Mäuse die systolische Funktion der Herzen dieser Tiere und einer Kontrollgruppe, denen keine PBLs injiziert worden waren, untersucht.

Dazu wurden Frequenzen, linksventrikuläre Drücke und als deren erster Ableitung die maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeiten ( $dp/dt \text{ max.}$ ) ermittelt. Diese Parameter für die Ventrikelfunktionen wurden gewählt, weil sie etabliert und im

klinischen Alltag gebräuchlich sind und weil sie reproduzierbar bei Mäusen untersucht werden können <sup>(116;136)</sup>.

In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich durch den Transfer von PBLs von Patienten mit Inf-KMP in SCID-Mäuse die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit als ein wichtiger Parameter für die Kontraktilität des linken Kammermyokards signifikant erniedrigt im Gegensatz zu den Tieren, die mit PBLs von gesunden Spendern rekonstituiert wurden bzw. zu den Tieren in der Kontrollgruppe, die keine PBLs injiziert bekamen.

Die Limitationen dieser Untersuchung sind methodischer Natur; Art und Zeitpunkt der Untersuchungen erlauben nur eine Aussage im Querschnitt. Über Beginn und zeitlichen Verlauf der Änderungen der Ventrikelfunktionen ist keine Aussage möglich. Durch Untersuchung der Mäuse zum Zeitpunkt 60 Tage nach Transfer ist auch keine Aussage möglich über Beginn und Verlauf der Infiltration des Myokards mit humanen Lymphozyten. Ebenfalls unbeantwortet bleibt die Frage nach dem zeitlichen Zusammenhang zwischen Beginn und Verlauf der lymphozytären Infiltration des Myokards, des Auftretens erster Myokardläsionen, Verlauf der Serumparameter und Beginn bzw. Verlauf meßbarer Dysfunktion des linken Ventrikelmyokards. Längsschnittstudien an denselben Tieren setzen eine völlig andere, z. Zt. noch nicht durchführbare Kathetertechnik mit nicht letalem Ausgang der Untersuchung voraus.

#### **IV.4 Die SCID-hu-PBL-Maus als Modell der humanen Inflammatorischen Kardiomyopathie**

Die SCID-hu-PBL-Maus bietet im Vergleich zu bislang etablierten Tiermodellen <sup>(135)</sup> der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie eine Reihe von Vorteilen. Gegenüber xenogenen immunkompetenten Zellen besitzt die SCID-Maus eine Immuntoleranz und ermöglicht so ein Überleben der transfundierten PBL´s über einen längeren Zeitraum. Funktionen des humanen Immunsystems und ihre Auswirkungen auf die Pathogenese der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie können dadurch in vivo untersucht werden. Die SCID-Maus ist das bislang einzige in vivo-Kultursystem des humanen Immunsystems; normale, also nicht transformierte Immunzellen überleben in anderen immundefizienten Mäusen wie z.B. der T-Zell-defizienten „Nackt“-Maus nicht <sup>(44)</sup>. Da es sich um ein tierexperimentelles Modell handelt, kann im Rahmen der Richtlinien des Tierschutzgesetzes manipulativ in die Transferbedingungen eingegriffen und so einzelne Parameter des Transfers gezielt untersucht werden. Die Autoimmunpathogenese in den Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie kann mit der SCID-hu-PBL-Maus durch Verwendung der peripheren Patienten-Blutlymphozyten direkt in vivo untersucht werden. Die PBL´s sind leicht zu gewinnen und durch ihren Transfer kann man die von den Patienten bekannten Autoimmunreaktionen in der SCID-Maus reproduzieren. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse anderer Maus-Modelle, die auf einem murinen Immunsystem basieren, auf den Menschen ist dadurch erschwert, daß unter Umständen andere Pathomechanismen als die im Menschen zum Tragen kommen. Weiterhin kann die Signifikanz von humanen T- oder B-Lymphozyten bzw. die Relevanz eines einzelnen Antigens für die Pathogenese der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie gezielt durch den differentiellen Transfer von Lymphozyten-Subpopulationen bzw. durch Immunisieren mit dem Antigen nach dem Transfer der humanen PBL´s getestet werden. Werden SCID-hu-PBL-Mäuse nach dem Transfer humaner Lymphozyten z.B. mit Tetanus-Toxoid immunisiert, kann in 50 - 80% der Tiere die Bildung humaner spezifischer anti-Tetanus-Toxoid-Antikörper nachgewiesen werden <sup>(42;43;99)</sup>. Somit läßt sich also eine sekundäre humorale Immunantwort der transfundierten humanen Zellen in der SCID-Maus auslösen.

Wenn Immunzellen in Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie bereits gegen ein Herzmuskelantigen sensibilisiert worden sind, kann durch die „Boosterung“ dieser Zellen mit dem Antigen nach dem Transfer in SCID-Mäuse die Aktivierung gegen das Antigen stimuliert werden. So kann also auf diese Weise die in vivo-Relevanz einzelner Antigene für die Pathogenese der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie systematisch untersucht werden. Das SCID-hu-PBL-Maus-Modell der humanen Inf-KMP bietet also insgesamt eine Reihe von theoretischen Vorteilen gegenüber herkömmlichen Tiermodellen.

Andererseits zeigt das SCID-hu-PBL-Maus-Modell der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie auch einige Nachteile gegenüber schon etablierten Tiermodellen. So stellt die qualitative und quantitative Analyse der verschiedenen Parameter 60 Tage nach Transfer lediglich eine Querschnittsuntersuchung dar. Unberücksichtigt bleibt dabei die Entwicklung der einzelnen Parameter im Verlauf der 60 Tage. Bislang gibt es nur wenige „follow-up“-Studien nach dem Transfer von PBL´s aus Patienten mit Autoimmunerkrankungen <sup>(73;75;69)</sup>. Die Problematik bei Längsschnittuntersuchungen liegt vor allem darin, daß durch Retroorbitalpunktion der SCID-Mäuse nur etwa 100 µl Blut gewonnen werden können; diese Menge reicht zur Analyse mehrerer humoraler oder gar zellulärer Parameter nicht aus. Zwar kann unter Ether-Narkose durch Herzpunktion eine größere Menge Blut abgenommen werden, jedoch ist diese Vorgehensweise mit einer deutlichen Mortalität behaftet und somit als Verlaufskontrolle ungeeignet.

Das „Target“ der zellulären humanen Immunantwort und die Antigen-Spezifität der infiltrierenden humanen Lymphozyten im Myokard der SCID-hu-PBL-Mäuse sind nicht bekannt. Eine subklinische xenogene Graft-versus-Host-Reaktion ist nicht mit Sicherheit auszuschließen. Das Problem der xenogenen GVH-Reaktion entfällt in anderen Tiermodellen.

Zwischen den transferierten humanen Lymphozyten und der SCID-Maus als Wirt gibt es durch die MHC-Differenzen zwischen den Tieren und den PBL´s der humanen Spender eine immunologische Barriere. Weiterhin sind die Mechanismen der Erkennung von Xeno-Antigenen letztendlich nicht wissenschaftlich geklärt, insbesondere da Makrophagen als Antigen-präsentierende Zellen bisher nur über ihr

Sekretionsprodukt TNF- $\alpha$  nachgewiesen wurden <sup>(77)</sup>. In anderen Tiermodellen stammt das Immunsystem aus dem Wirt, so daß MHC-Inkompatibilitäten nicht auftreten und ein normales Funktionieren der Makrophagen gesichert ist.

Die Variabilität der Rekonstitution mit transferierten humanen PBL's war in den hier diskutierten Ergebnissen groß, auch bei identischer Zellzahl des gleichen Spenders in verschiedene SCID-Mäuse. Verantwortlich scheinen dafür Faktoren auf der Seite des Wirts, also der SCID-Maus, zu sein. Unterschiede bezüglich der Injektionsorte innerhalb der Peritonealhöhle (Omentum majus vs. freie Bauchhöhle) oder unterschiedliche Aktivität der NK-Zellen, die die Abstoßung der humanen Zellen beeinflussen <sup>(64)</sup>, könnten die Variabilität der Rekonstitution mit humanen PBL's in den einzelnen Tieren erklären. Andererseits ergibt sich dadurch die Möglichkeit, durch Suppression der murinen NK-Zellen die Bedingungen für den Transfer humaner PBL's zu verbessern, entweder durch Antiseren gegen NK-Zellen <sup>(64)</sup> oder durch Bestrahlung <sup>(41;65)</sup>. Wie schon erwähnt, konnte allerdings die Beobachtung anderer Autoren, daß ohne diese Vorbehandlung der Tiere vor dem Transfer eine zufriedenstellende Rekonstitution nicht gewährleistet wird, in der hier vorgestellten Arbeit nicht bestätigt werden <sup>(65)</sup>.

Zuletzt ist es technisch sehr aufwendig und schwierig, das Herz der SCID-Maus für funktionelle Untersuchungen in die „Working Heart“-Apparatur nach Langendorff einzuspannen. So kann im Gegensatz zu anderen Tiermodellen der inflammatorischen Kardiomyopathie, die auf Meerschweinchen oder Ratten basieren, bisher zufriedenstellend vorerst nur die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dP/dt \text{ max.}$  bestimmt werden.

Die Nachteile des SCID-hu-PBL-Maus-Modells der Inf-KMP sind insgesamt betrachtet jedoch überwiegend methodisch bedingt und daher durch entsprechende Optimierung des Transfers weitestgehend zu beseitigen.

Zusammenfassend scheint die SCID-hu-PBL-Maus nach den bisher vorliegenden Ergebnissen ein geeignetes in vivo-System für das Studium der (Auto-) Immunpathogenese der humanen Inf-KMP zu sein. Der Wert des SCID-hu-PBL-Modells im Vergleich zu anderen Tiermodellen wird sich aber erst noch in weiteren Studien erweisen müssen, um die SCID-hu-PBL-Maus als ein akzeptiertes in vivo-Modell der

humanen inflammatorischen Kardiomyopathie zu etablieren. Dies gilt einerseits für die noch zu zeigenden humoralen und zellulären Mechanismen, die zur Entstehung der humanen lymphozytären Infiltrate in den Mäuseherzen führen. Andererseits gilt dies vor allem für die noch zu verfeinernde Methodik bei der Untersuchung von hämodynamischen Parametern der Mäuseherzen.