

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Tiere

Sämtliche homozygoten C.B.17 scid/scid-Mäuse wurden von der Firma BOM-Mice, Kopenhagen, Dänemark bezogen. Die Tiere waren männlich und zum Zeitpunkt des Zelltransfers 8 bis 10 Wochen alt.

II.1.2. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen MERCK, Darmstadt und SIGMA, Deisenhofen bezogen, wenn an entsprechender Stelle nicht anders angegeben.

II.1.3. Geräte

Folgende Geräte kamen zur Anwendung:

ELISA-Reader:	Titertek Multiscan Plus MKII, ICN FLOW, Meckenheim
ELISA-Washer:	Titertek Microplate Washer M 96, Fa. ICN FLOW
Zentrifugen:	Haereus Minifuge T, HAEREUS, Hanau Jouan BR 3.11 Tischzentrifuge, Fa. DUNN
Sterile Werkbank:	ESI Flufrance, DUNN-Labortechnik, Asbach
Pipetten:	Gilson Pipetman, GILSON, Villiers-le-Bez, Frankreich
Brutschrank:	CO ₂ -Auto-Zero, Fa. HAEREUS
Wasserbad:	Köttermann, Hänigsen
Rüttler:	Mixer 5432, EPPENDORF, Hamburg SM 25, Bühler Laborgerätebau, Tübingen
Mixer:	Janke und Kunel VF 2, IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
Photometer:	Uvikon 940, KONTRON, Eching
Kryotom:	Frigocut 2800, REICHERT-JUNG, Wien, Österreich
Mikroskop:	Leica DMRD, LEICA Mikroskopie und Systeme, Wetzlar
Inkubator:	NALGENE, GB
Durchfluß-Zytometer:	FACScan, Becton Dickinson, San Jose, USA
Druckaufnehmer:	STATHAM P23DB, Fa. GOULD, Mass., USA

Verstärker:	DC Bridge Amplifier 660, HUGO SACHS Elektronik, Freiburg
Registriereinheit:	WR 3101 Linearcorder Mark VII, GRAPHTEC Corp., Tokyo, Japan
Frequenzmodul:	HRM 669, HUGO SACHS Elektronik, Freiburg
Differentiator:	Slope Quotient Coupler 575, HUGO SACHS Elektronik, Freiburg
Waage:	Feinweight 2, Fa. SARTORIUS

II.2. Methoden

II.2.1 Patienten und Kontrollen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Lymphozyten von 9 Patienten (nachfolgend mit den Buchstaben A bis I gekennzeichnet) mit Verdacht auf inflammatorische Kardiomyopathie in SCID-Mäuse übertragen.

Es wurde die Diagnose einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) nach den folgenden Kriterien der WHO/ISFC task force ⁽³⁰⁾ gestellt:

- 1) Vorliegen einer chronischen Erkrankung des Herzmuskels unbekannter Ätiologie ohne Assoziation mit anderen Erkrankungen, insbesondere der koronaren Herzkrankheit.
- 2) Ausschluß einer spezifischen Erkrankung des Herzmuskels, z.B. bei Alkoholabusus oder Stoffwechselerkrankungen.
- 3) Vorliegen einer Dilatation der Herzkammern, besonders des linken Ventrikels, sowie einer globalen linksventrikulären Funktionsstörung.
- 4) Vereinbarkeit des histologischen Befundes der rechtsventrikulären Endomyokardbiopsie mit der Diagnose einer DCM.

In der Vorgeschichte der Patienten wurde z.T. eine virale Infektion angegeben, die dem Beginn der Symptomatik vorausging. Eine akute Myokarditis entsprechend der Dallas-Kriterien ⁽³¹⁾ war jedoch bei keinem Patienten nachweisbar.

Es wurden im Serum der Patienten keine erhöhten Antikörper-Titer gegen kardiotope Viren, abgesehen von einem üblichen Durchseuchungstiter gegen Enteroviren, nachgewiesen. Insbesondere fanden sich keine IgM-Antikörper gegen kardiotope Viren.

Die klinischen Untersuchungsergebnisse der einzelnen Patienten sind in der nachfolgenden Tabelle 1 (Seite 14) angegeben:

Legende zu Tabelle 1:

Bei den EKG-Veränderungen bedeuten:

HF Herzfrequenz,
 LSB Linksschenkelblock,
 VES Ventrikuläre Extrasystolen.

Bei den Echokardiographie-Befunden bedeuten:

LA Linker Vorhof,
 LV Linker Ventrikel,
 LVEDD Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser,
 AI Aortenklappeninsuffizienz,
 MI Mitralklappeninsuffizienz,
 TI Trikuspidalinsuffizienz.

Bei den Herzkatheter-Daten bedeuten:

PAP Pulmonalarterien-Druck,
 PCP Druck in den Lungenkapillaren,
 CI Herzindex (Herzzeitvolumen bezogen auf die Körperoberfläche),
 LVEDP Linksventrikulärer enddiastolischer Druck,
 LVEDV Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen,
 RCA/LCA Rechte/Linke Koronararterie.

Tabelle 1: Klinische Daten der Patienten

	<i>Initialen</i>	<i>Alter</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Anamnese</i>	<i>Ruhe-EKG</i>
Pat. A	G. K.	53	M	Grippaler Infekt, Dyspnoe, Beinödeme, Anasarka	Sinusrhythmus, HF 115/min, Überdrehter Linkstyp, LSB (komplett), Erregungsrückbildungsstrg.
Pat. B	G. P.	55	W	Grippaler Infekt, progrediente Dyspnoe, Pleuraergüsse, Ödeme, obere Einflußstauung	Sinusrhythmus, HF 94/min, Überdrehter Linkstyp, AV-Block I°, LSB (komplett), Kammerendteilveränderungen
Pat. C	P. H.	55	M	Grippaler Infekt, progrediente Dyspnoe, chron. Pleuraergüsse, starke Leistungsmind.	Steiltyp, Absoluta, HF 107/min, intermitt. Vorhofflimmern, Kammerendteilveränderungen
Pat. D	E. A.	60	M	Ruhedyspnoe, massive Beinödeme, mehrfach Globaldekomensation, kein Infekt errinnerlich	Überdrehter Linkstyp, LSB (komplett), HF 88/min, Sinus- rhythmus, gehäuft VES, Erregungsrückbildungsstrg.
Pat. E	J. N.	61	M	Grippaler Infekt, öfter Herzrasen, periphere Ödeme, progrediente Dyspnoe	Linkstyp, HF 65/min, Vorhofflattern mit 2 : 1- Überleitung, Kammerendteilveränderungen
Pat. F	M. M.	36	W	Progrediente Ruhe- dyspnoe, mehrfach Globaldekomensation, Oberbauchbeschwerden	Linkstyp, Sinusrhythmus, HF 105/min, diskrete Zeichen einer Linksherzhypertrophie
Pat. G	C. Z.	53	M	Belastungsdyspnoe, pul. Infekt, Beinödeme, retrostern. Schmerzen, obere Einflußstauung	Absolute Arrhythmie bei Vorhofflimmern, Überdrehter Linkstyp, HF 100/min, Kompletter LSB
Pat. H	B.O.	24	W	Schwäche, Abgeschla- genheit, keine Dyspnoe, retrost. Schmerzen, kein Infekt errinnerlich	Sinusrhythmus, HF 83/min, Steiltyp, inkompletter RSB, deutliche ST-Überhöhung in II, III, aVF, V ₂ -V ₆
Pat. I	G. K.	54	M	Häufig grippale Infekte, progred. Belastungs- dyspnoe, mehrfach Globaldekomensation	Indifferenztyp, Sinusrhythmus, HF 62/min, kompletter LSB, Kammerendteilveränderungen

	Echokardiographie	Koronarstatus	Medikation
Pat. A	LA 55 mm, RV 40 mm, LVEDD 88 mm, MI Grad 2, LV-Funktion global eingeschränkt	Kein Nachweis stenosierender Veränderungen bis in die Peripherie, Kaliberstarke Koronarien	Anti-Arrhythmika Diuretika ACE-Hemmer Nitrate
Pat. B	LA 50 mm, RV 26 mm, LVEDD 80 mm, MI Grad 1, LV-Funktio diffus hochgradig eingeschränkt	Links glatter, unauffälliger Gefäßverlauf bis in Peripherie, rechts ca. 30%ige Ostiumstenose bei sonst kräftigem, glattem Gefäß	Diuretika ACE-Hemmer Nitrate
Pat. C	LA 45 mm, RV 25 mm, LVEDD 66 mm, LV- Kontraktionen höhergradig eingeschränkt	Kein Nachweis stenosierender Veränderungen bis in die Peripherie	Anti-Arrhythmika Diuretika ACE-Hemmer Nitrate
Pat. D	LA 45 mm, RV < 25mm, LVEDD 75 mm, MI Grad 1, LV-Kontraktionen insgesamt diffus hochgradig eingeschr.	LCA: unauffälliger, gestreckter Gefäßverlauf bis in Peripherie, RCA: dünnkalibrig, keine Stenosen nachweisbar	Diuretika ACE-Hemmer Nitrate
Pat. E	LA 51 mm, RV 45 mm, LVEDD 63 mm, TI Grad 2 LV-Kontraktionen diffus hochgradig eingeschränkt	Kein Nachweis von Stenosen, glatte Gefäße, ausgeprägter Linksversorgungstyp	Anti-Arrhythmika Diuretika ACE-Hemmer Nitrate
Pat. F	LA 52 mm, RV < 25mm, LVEDD 86 mm, LV-Funktion höchstgradig eingeschränkt, MI, TI, PI (alle Grad 1)	Keine Stenosen nachweisbar bei normalkalibrigen, lang- gestreckten Gefäßen	Diuretika ACE-Hemmer
Pat. G	LA 53 mm, RV 40 mm, LVEDD 63 mm, MI+TI (beide Grad 1), diffus höchstgradig eingeschr. LV-Kontraktionen	Keine Stenosen und Wand- veränderungen von LCA und RCA bis in die Peripherie	Anti-Arrhythmika Diuretika ACE-Hemmer Nitrate
Pat. H	LA, LV, RA und RV normal groß, LV-Kontrakt. Diffus mäßig eingeschränkt, inverse Septumbewegungen, Pericarderguß (hämodynamisch unbedeutend)	LCA und RCA völlig unauffällig	Digitalis und ACE-Hemmer
Pat. I	LA 50 mm, RV 20 mm, LVEDD 89 mm, MI GRAD 1, höchstgradig eingeschränkte LV-Kontraktionen	Kaliberstarke, stark gestreckte Koronarien ohne Stenosen bis in die Peripherie bei eingeschr. koronarer Regulationsbreite	Anti-Arrhythmika Diuretika ACE-Hemmer

Virusserologie									
	Pat. A	Pat. B	Pat. C	Pat. D	Pat. E	Pat. F	Pat. G	Pat. H	Pat. I
Influenza A	1:10	1:5	----	----	1:<5	1:5	1:10	1:5	1:10
Influenza B	1:<5	1:<5	----	----	1:10	1:<5	1:5	1:5	1:5
Parainfluenza I	1:<5	1:<5	----	----	1:<5	1:<5	1:5	1:<5	1:<5
Parainfluenza II	1:<5	1:10	----	----	1:<5	1:<5	1:5	1:<5	1:<5
Parainfluenza III	1:80	1:10	----	----	1:10	1:<5	1:10	1:<5	1:10
Coxsackie/Echo	1:20	1:5	1:20	----	1:20	1:20	1:20	1:10	1:40
Cytomegalie	1:10	1:5	1:<5	----	1:<5	1:<5	1:40	1:5	1:<5
RSV	1:<5	1:<5	1:5	----	1:5	1:<5	1:10	1:10	1:<5
Adeno-Viren	1:<5	1:<5	1:<5	----	1:<5	1:<5	1:5	1:<5	1:<5
Hämodynamik									
	Pat. A	Pat. B	Pat. C	Pat. D	Pat. E	Pat. F	Pat. G	Pat. H	Pat. I
PAP	60/32	60/28	25/14	40/24	60/26	26/10	55/20	21/10	32/16
PCP	43/28	40/24	13/11	13/10	38/19	10/7	20/14	----	28/14
CI	2,2	2,0	1,8	2,6	2,6	2,2	2,8	1,5	2,0
LVEDP	28	28	28	36	32	30	32	24	26
(alle in mmHg)									
LVEDV (in ml)	690	↑	↑	↑	↑	410	↑	mäßig↑	↑↑
EF (in%)	21	28,5	31	----	37	20	10	----	16
HZV (in l)	----	4,3	3,7	4,7	5,1	3,0	5,9	2,4	3,8
Immunhistologie									
	Pat. A	Pat. B	Pat. C	Pat. D	Pat. E	Pat. F	Pat. G	Pat. H	Pat. I
Zelluläre Infiltrate	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Lymphozytäre Infiltrate	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
CD3 ⁺ -Zellen	4.7	2.2	4.1	2.8	4.1	1.7	2.7	12.0	2.0
CD4 ⁺ -Zellen	2.3	1.6	0.9	2.1	3.7	1.5	2.3	7.2	0.8
CD8 ⁺ -Zellen	1.1	0.8	2.1	1.0	1.1	0.0	1.0	7.0	1.2
Makrophagen	0.9	1.1	1.9	1.2	2.1	0.6	2.2	9.6	2.3
HLA-Expression (Interstitium + Gefäße)	verstärkt u.a.		g.w.	verstärkt	verstärkt	u.a.	verstärkt	verstärkt	verstärkt
(Alle Zellzahlen in Anzahl/Gesichtsfeld) ; (g.w. = grenzwertig) ; (u.a. = unauffällig)									

Bei der konventionellen Histologie zeigten sich in den Endomyokardbiopsien aller Patienten eine leichte bis mittelgradige interstitielle Fibrose und ein erhöhter Zellgehalt im Interstitium bei herdförmig geringen Verzweigungsstörungen der Myozyten. Alle Patienten wurden digitalisiert. Bei keinem der Patienten ließen sich anti-nukleäre, anti-mitochondriale bzw. gegen glatte Muskulatur gerichtete Antikörper nachweisen. Lediglich beim Nachweis zirkulierender Immunkomplexe waren die Werte bei zwei Patienten grenzwertig. Patient A zeigte in der Anti-Myosin-Myokard-Szintigraphie einzelne mäßig ausgeprägte Myozytolysen, Patient I zeigte bei der Myokardperfusionsszintigraphie eine leichte belastungsinduzierte Minderaktivität im Vorderwandbereich. Neben einer bei allen Patienten vorhandenen deutlich erniedrigten Herzfrequenzvariabilität fanden sich bei den Patienten, die in Ruhe normale bzw. noch normale Drücke bei den Herzkatheter-Daten zeigten, unter Belastung deutlich erhöhte Drücke im kleinen Kreislauf. Der CI-Anstieg unter Belastung war bei allen Patienten als absolut unzureichend zu bezeichnen. Alle Patienten waren bezüglich Lues-, Hepatitis-, Streptolysin- und EBV(IgM)-Serologie negativ. Patientin H wurde während des akuten Krankheitsverlaufs mehrfach biopsiert; angegeben wurden deshalb die Immunhistologie-Daten der Myokardbiopsie, die der Blutentnahme zeitlich am nächsten lag.

Die Auswahl der Patienten mit Verdacht auf inflammatorische Kardiomyopathie für einen Transfer ihrer Lymphozyten in die SCID-Mäuse fand anhand folgender Kriterien statt:

- 1) Keine bzw. keine vorrangegangene Behandlung mit immunsuppressiven Pharmaka.
- 2) Negative oder allenfalls grenzwertige Epstein-Barr-Virus (EBV)-Serologie, da es in SCID-Mäusen mit transferierten Lymphozyten von Patienten mit positiver EBV-Serologie nach 70 bis 120 Tagen gehäuft zu einer lymphoproliferativen Erkrankung der übertragenen Humanzellen, die alle Mausorgane betraf ^(100; 96), gekommen war.
- 3) Hohe IgG- bzw. IgM-anti-ANT-Antikörpertiter im Patientenserum als Hinweis auf eine ablaufende Autoimmunreaktion gegen Strukturen des Herzmuskels.

Vorangegangene Studien konnten zeigen, daß nur Lymphozyten von Patienten mit hohem Autoantikörper-Titer nach Transfer in die SCID-Maus die von den Patienten bekannten humanen Autoantikörper bilden ^(73; 72;77;112).

Es wurde daher ein entsprechendes Screening der Patienten mit Myokarditis und DCM durchgeführt und 9 geeignete Patienten ausgewählt.

Alle Patienten wurden vorab eingehend über Art und Zielsetzung dieser Arbeit aufgeklärt und gaben für die Blutspende und die weitere Verwendung ihres Blutes ihre Zustimmung.

Ebenfalls ihre Zustimmung für diese Arbeit gaben neben den neun herzkranken Patienten vier herzgesunde Blutspender mit negativer EBV-Serologie und negativem bzw. normalem IgG- und IgM-Autoantikörper-Titer gegen den ANT (<1:40), deren Lymphozyten ebenfalls in SCID-Mäuse übertragen wurden.

II.2.2. Handhabung und Haltung der Versuchstiere

Vom Regierungspräsidenten Düsseldorf wurde ein entsprechender Tierversuchsantrag für die Durchführung dieser Arbeit genehmigt. Die Haltung der SCID-Mäuse in der zentralen Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf fand unter spezifiziert pathogen-freien (SPF) Bedingungen statt. Die Tiere wurden in sterilen Käfigen gehalten und erhielten steriles, pelletiertes Futter sowie azidifiziertes Wasser (ph=3) ad libitum. Eine prophylaktische antibiotische Behandlung der Tiere vor dem Zelltransfer wurde nicht durchgeführt, da eine solche bei vorherigen Studien zu einer signifikant verminderten Synthese von humanen Immunglobulinen in der SCID-Maus geführt hatte ⁽⁷⁵⁾. Die Tiere waren zum Teil durch die Firma BOM-Mice, Kopenhagen, Dänemark auf „leakiness“ serologisch vorgetestet, um nur solche mit einer kompletten Ausprägung der Mutation zu haben. Es wurden ausschließlich Tiere mit einem Maus-IgG-Spiegel von weniger als 0.5 µg/ml Serum verwendet, da sich gezeigt hatte, daß der „leaky“-Phänotyp mit einer erhöhten Abstoßungsrate von allogenen und xenogenen Transplantaten assoziiert ist ⁽¹⁰¹⁾. Zum Zeitpunkt des Transfers waren alle Mäuse ca. 8-12 Wochen alt. Die Tiere wurden nach der intraperitonealen Injektion ⁽²⁹⁾ von jeweils 50×10^6 PBL`s (in 1ml

Puffer resuspendiert) eines Spenders in mindestens zwei, meistens jedoch drei Mäuse für weitere 60 Tage in der TVA gehalten.

Der Zeitraum von 60 Tagen wurde gewählt, da 60 Tage nach Transfer ein Zeitpunkt ist, der:

- a) nach dem Auftreten einer akuten Graft-versus-Host-Reaktion (GVHD) liegt ⁽⁴⁷⁾,
- b) vor dem Auftreten einer chronischen GVHD liegt ⁽⁴⁶⁾,
- c) der Plateau-Phase der humanen Immunglobuline G und M im Serum der SCID-Maus entspricht ^(63;99) und
- d) der vor dem Auftreten einer eventuellen EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung liegt ⁽¹⁰⁰⁾.

Nach 60 Tagen wurden dann durch direkte Punktion des linken Ventrikels nach entsprechender vorangegangener Präparation der Mäuse unter Ether-Narkose Daten über die Kammerhämodynamik des linken Herzens gewonnen.

Anschließend wurden die Tiere ausgeblutet, durch Genickbruch infolge Streckens getötet und Herz, Skelettmuskel (M.psoas), Milz, Niere und Leber unter sterilen Bedingungen präpariert und entnommen.

II.2.3. Isolierung der Lymphozyten und Transfer derselben in die SCID-Maus

Den Patienten und den Kontrollpersonen wurden unter sterilen Bedingungen jeweils 150 bis 250 ml Blut aus einer peripheren Vene in heparinisierte Perfusorspritzen entnommen. Jeweils 10 ml Blut wurden mit der gleichen Menge Puffer (PBS / Fa. BIOCHROM, Berlin) verdünnt und in einem 50 ml-Röhrchen (Fa. GREINER, Solingen) vorsichtig auf 20 ml Ficoll-Lösung (1,077g / ml, Fa. BIOCHROM) aufgetragen. Die zellulären Bestandteile des Blutes wurden anschließend nach dem Prinzip eines Dichtegradienten durch 25-minütiges Zentrifugieren bei 25° C und 1000g aufgetrennt ⁽¹⁰⁾. Dann wurden die Lymphozyten aus der Grenzschicht zwischen der Ficoll-Lösung und dem PBS-Puffer abgesaugt, in ein anderes Röhrchen umgefüllt, mit RPMI 1640 (Fa. BIOCHROM) einschließlich Gentamicin (50mg / l), Penicillin (2000 IU / l) und Streptomycin (100mg / l) verdünnt und bei

20° C und 482g zehn Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde nach Dekantieren des Überstandes und Resuspension des Lymphozytenpellets in RPMI / PSG erneut gewaschen. Nach dem Zählen der Zellen in Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer wurde schließlich die Zellkonzentration auf 50×10^6 Zellen / ml eingestellt. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurden die so isolierten Lymphozyten anschließend analysiert. Aufgrund der geringen Volumina wurde aus dem peripheren Blut der SCID-Maus 60 Tage nach Transfer kein herkömmlicher Ficoll-Gradient durchgeführt, sondern es erfolgte eine direkte Anfärbung der Zellen mit anschließender Lyse der Erythrozyten.

II.2.4 Durchfluß-Zytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf Grundlage der simultanen Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften im weiteren Sinne, hier von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen der einzelnen Zelle. Dabei werden Zellen mit an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern markiert und nach Anregung mit einem Laser die relative Zellgröße, die Granularität und zwei Fluoreszenzfarben gleichzeitig für die Einzelzellen gemessen. Es wurden Phycoerythrin (PE)- und Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte Antikörper für die Markierung verwendet, mit einem Argon-Laser erfolgte die Anregung bei 488 nm, die Emission bei 576 nm (PE) bzw. 525 nm (FITC). Bei der Untersuchung der Zellen aus dem peripheren Blut der SCID-Maus wurden zur Analyse der humanen Lymphozyten ausschließlich direkt markierte Antikörper verwendet, da der bei einer indirekten Markierung erforderliche Zweitantikörper (anti-Maus-IgG bei monoklonalem Antikörper aus der Maus als Erstantikörper) mit Oberflächenstrukturen auf murinen Granulozyten kreuzreagiert ⁽⁸⁾. Wie entsprechende Vorversuche zeigten konnte diese Kreuzreaktion, die auch bei „non-leaky“-Tieren vorkommt, nicht unterdrückt werden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Antikörper, die sowohl zur Markierung von Zellen aus dem peripheren Blut der SCID-Maus als auch zur Messung der Gesamt-PBL`S aus dem peripheren Blut der gesunden und erkrankten Spender verwendet wurden.

Für die direkte Immunfluoreszenz wurden 100 µl Vollblut (bei einigen Ausnahmen weniger, je nach den zur Verfügung stehenden Mengen / siehe unten) in ein FACS-Röhrchen gefüllt (FALCON 2052, Fa. BECTON DICKINSON) und mit den entsprechenden Antikörpern 15 min bei 20°C im Dunkeln auf einem Rüttler inkubiert. Danach wurde zur Lyse der Erythrozyten 2 ml Lysing Solution (Stammlösung 1:10 in dH₂O verdünnt, Fa. BECTON DICKINSON) und 45 bis 60 Sekunden bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen sofort auf Eis gestellt, 2 ml FACS-Puffer, bestehend aus Rinderserumalbumin (BSA) 0,1% (Fa. SIGMA), NaN₃ 0,1% in PBS (Fa. BIOCHROM), zugegeben und bei 200g und 4°C 10 min lang zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml FACS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dem erneuten Abpipettieren des Überstandes wurde die Zellsuspension in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Auswertung (innerhalb von 24 h) im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die Messungen der Zellen wurden mit einem FACScan (Fa. BECTON DICKINSON) und der dazugehörigen Software durchgeführt. Es wurden bei jeder Messung 5000 Zellen ausgewertet. Das „gating“ der Zellen erfolgte aufgrund Ihrer Eigenschaften bei Vorwärtsstreulicht (forward scatter) und 90°-Streulicht (side scatter), die quantitative Analyse erfolgte mit Hilfe der Quadrantenstatistik. Bei einigen Mäusen standen wegen der unterschiedlichen Mengen Vollblut, die durch Ausbluten der Mäuse gewonnen wurden, nur 50 oder 25 µl für die einzelne FACS-Analyse zur Verfügung; diese Mengen wurden anschließend mit Puffer ad 100 µl aufgefüllt, wobei dementsprechend auch jeweils die Arbeitskonzentrationen der Antikörperlösungen angepaßt wurden.

Tabelle 2: Markierungen für die Durchflußzytometrie

	Antikörper	Spezifität	Bezugsquelle/ Hersteller	Arbeits- konzentration
Doppel- Markierungen				
1	Maus-anti CD3, human + PE	humane T-Lymphozyten	IMMUNOTECH S.A. (über DIANOVA)	20µl auf 100µl Vollblut oder 2x10 ⁵ Zellen
	Maus-anti CD19, human +FITC	humane B-Lymphozyten		
2	Maus-anti CD4, human + FITC	humane T-Helfer- Lymphozyten	IMMUNOTECH S.A. (über DIANOVA)	20µl auf 100µl Vollblut oder 2x10 ⁵ Zellen
	Maus-anti CD8, human + PE	humane zytotox- ische / Suppressor- T-Lymphozyten		
Einzel- Markierungen				
3	Maus-anti CD14, human + PE	hum. Monozyten/ Makrophagen	IMMUNOTECH S.A. (über DIANOVA)	20µl auf 100µl Voll- blut oder 5x10 ⁵ Zell.
4	Maus-anti CD25, human + PE	humaner IL-2- Rezeptor	IMMUNOTECH S.A. (über DIANOVA)	20µl auf 100µl Voll- blut oder 5x10 ⁵ Zell.
5	Maus-anti CD45, human + FITC	humane Leukozyten	IMMUNOTECH S.A. (über DIANOVA)	20µl auf 100µl Voll- blut oder 5x10 ⁵ Zell.
6	Maus-anti CD57, human + FITC	humane NK-Zellen	IMMUNOTECH S.A. (über DIANOVA)	20µl auf 100µl Voll- blut oder 5x10 ⁵ Zell.
7	Hamster-anti CD3-ε, murin + FITC	murine T-Lymphozyten	BOERINGER MANNHEIM	5µg/ml oder 100µl auf 100µl Vollblut
8	Ratte-anti T200/ CD45, murin + FITC	murine Leukozyten	BOERINGER MANNHEIM	5µg/ml oder 100µl auf 100µl Vollblut

II.2.5 Quantitative Bestimmung von Maus-IgG

Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut vor dem Test bei 1743 g und 20°C 15 min lang abzentrifugiert. Mit der quantitativen Bestimmung des Maus-IgG wurde ein Teil der SCID-Mäuse vor dem Transfer der Lymphozyten serologisch auf „leakiness“ getestet. Dazu wurde ein komplettes Testsystem (Fa. BOEHRINGER, Mannheim) verwendet, das auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) beruht. Die nachfolgende Abbildung 1 beschreibt das Prinzip des Testes.

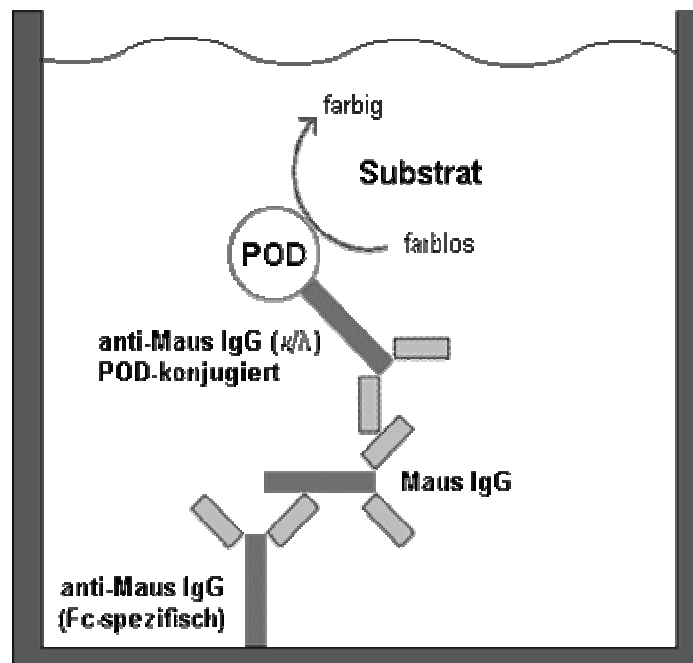
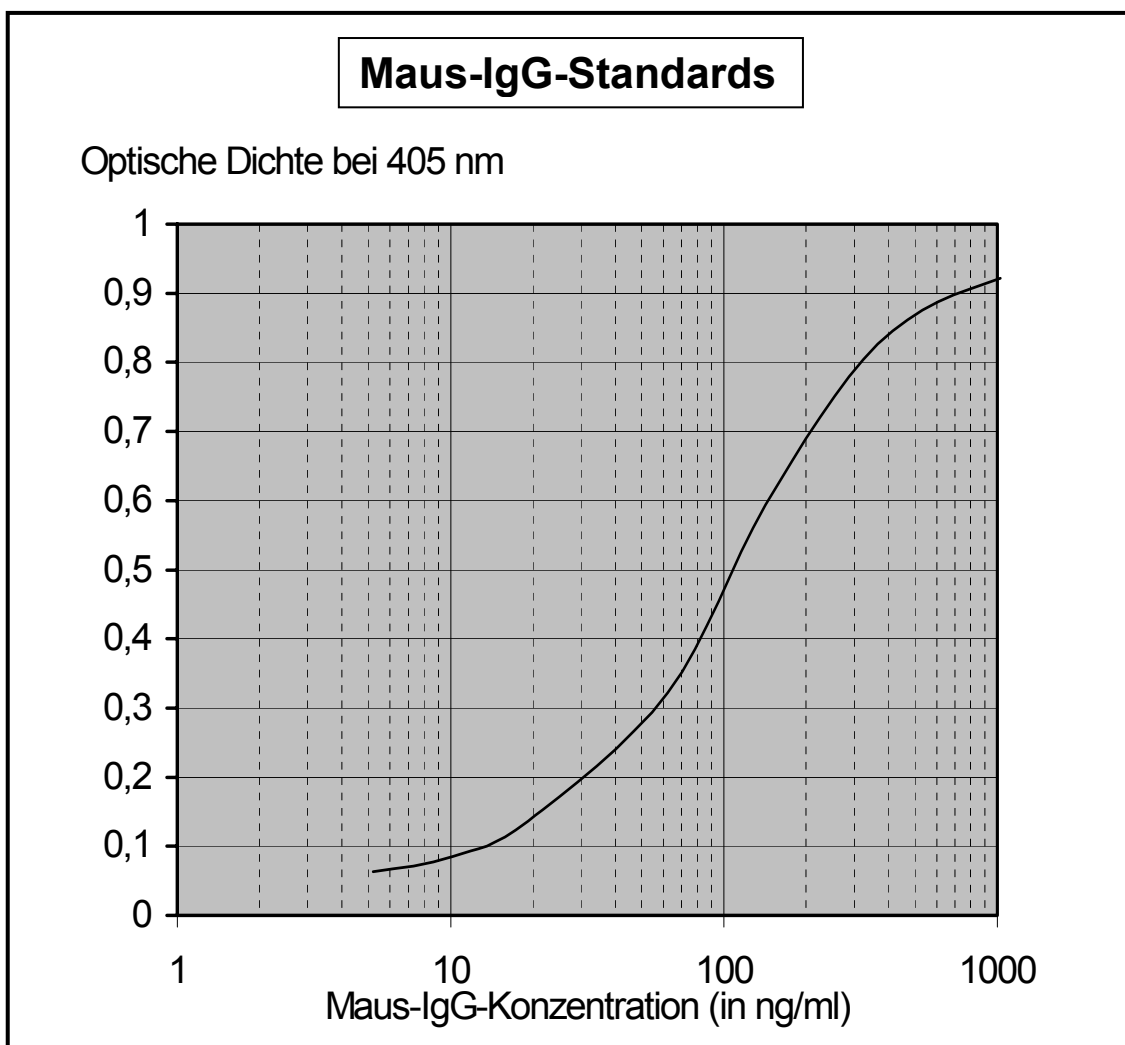


Abbildung 1: Testprinzip des Maus-IgG-ELISA

Zuerst wurde ein spezieller Fangantikörper adsorptiv an die Wand der Mikrotiterplatte gebunden. Es handelt sich dabei um polyklonales Schaf-anti-Maus-IgG (Fc-spezifisch), das alle Maus-IgG-Subklassen gleich gut erkennt. Dann wurde nach Beschichtung mit Blockierungsreagenz zur Blockade freier Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte mit dem Serum der SCID-Maus inkubiert, wobei die zu messenden Antikörper (Maus-IgG) an den an der Wand adsorbierten Fangantikörper binden. Durch ein Peroxidase (POD)-markiertes, ausgewogenes Gemisch aus anti-Maus- κ - und anti-Maus- λ -Antikörpern wurde anschließend POD an das Maus-IgG fixiert. Bei

der Inkubation mit einem Substrat-System entstand durch die Reaktion mit der fixierten Peroxidase ein Farbstoff, der photometrisch erfasst wurde. Die Stärke der Farbreaktion (optische Dichte nach Ende der Farbreaktion) war dabei dem gebundenen Maus-IgG proportional. Über eine Standardkurve mit bekannter Maus-IgG-Konzentration erfolgte die Auswertung. Die Verwendung des Test-Kit erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers und hatte eine Nachweisgrenze von 10 ng Maus-IgG/ml Serum. Die nachfolgende Abbildung 2 zeigt eine typische Standardkurve; die Auswertung erfolgte graphisch, wobei man eine Standardkurve durch Auftragen der optischen Dichte der Standards gegen deren bekannte Maus-IgG-Konzentrationen erstellt. Die Werte für die zu messenden Proben wurden dann an dieser Standardkurve abgelesen.

Abbildung 2: Typische Standardkurve des Maus-IgG-ELISA



II.2.6 Quantitative Bestimmung von humanem IgG und IgM

Sowohl aus dem Serum der Blutspender als auch aus dem Serum der SCID-Mäuse 60 Tage post Transfer erfolgte die quantitative Bestimmung der humanen Immunglobuline nach dem Prinzip der einfachen radialen Immundiffusion. Die dabei verwendeten Platten waren mit einem Antiserum (Ziege-anti humanes IgG bzw. IgM) -haltigen Gel in gleichmäßiger Schicht auf ebener Grundfläche beschickt. Aus Reservoirs, die in das Gel eingestanzt sind, diffundieren die Antigen-Moleküle (humanes IgG bzw. IgM) radial in die Umgebung und präzipitieren mit dem spezifischen Antiserum. Die ringförmigen Präzipitate vergrößern sich so lange, wie der Antigen-Vorrat zur Aufrechterhaltung eines Konzentrationsgefälles ausreicht. Das Ende der Diffusion ist erreicht, wenn dies nicht mehr der Fall ist. Die quadrierten Durchmesser der Präzipitate sind dann der Antigen-Konzentration proportional. Auf jeder Platte wurden verschiedene Standardseren mit bekannter Antigen-Konzentration zur Erstellung einer Standardkurve mitgeführt⁽¹⁰³⁾. Verwendet wurden Immundiffusionsplatten, entweder Typ NOR (Normiert, Optimiert, Radial)-HC (High Concentration) bzw. -MC (Medium Concentration) oder Typ LC (Low Concentration) und Standardseren, beides von BEHRING, Marburg. Die verschiedenen Platten, die zur Anwendung kamen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

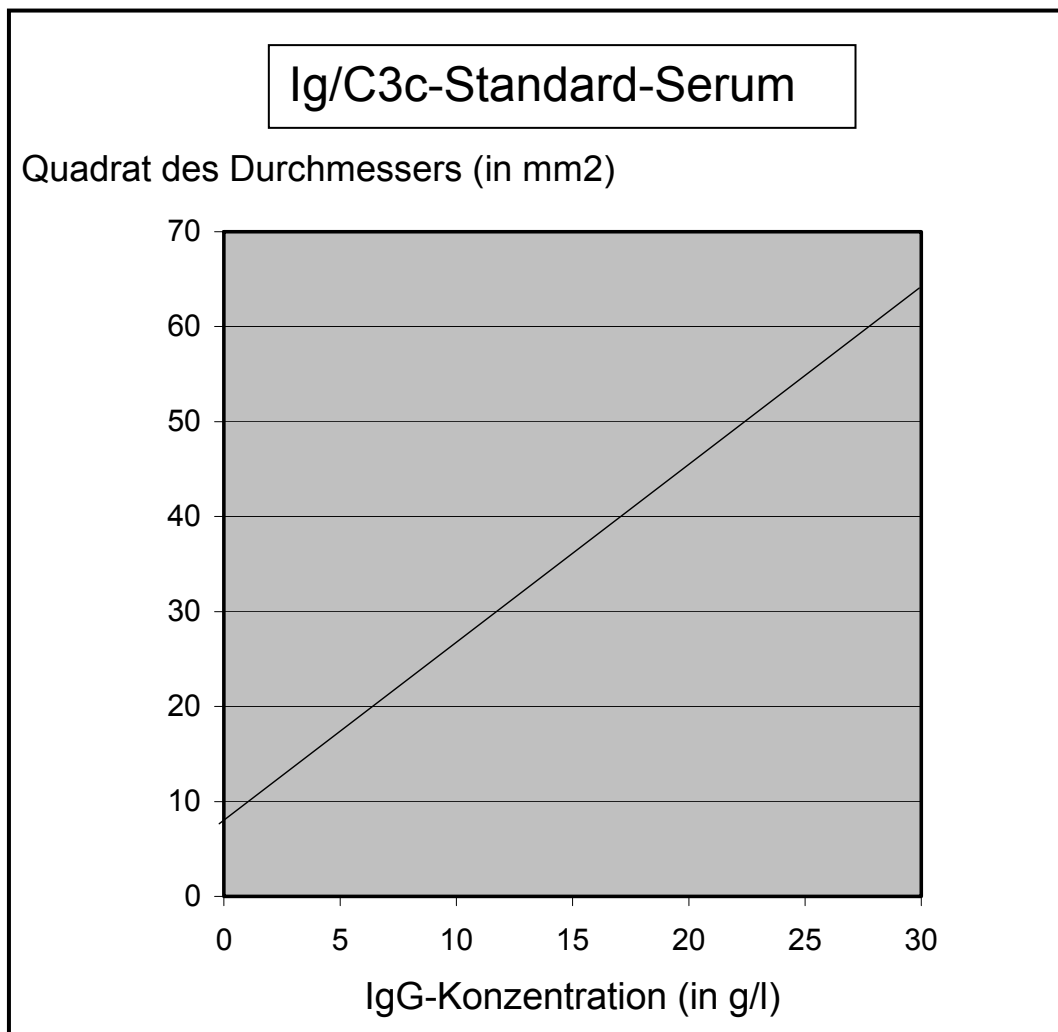
Tabelle 3: Verwendete Immundiffusionsplatten

Plattenart	Meßbereich	Auftragsvolumen	Standard-Serum
NOR-Partigen-IgG-HC	2,5-37,7 g IgG/l	5 µl	Ig/C3c-Standard
NOR-Partigen-IgG-MC	0,23-3,4 g IgG/l	5 µl	Ig/C3c-Standard (1:10 verdünnt)
LC-Partigen-IgG	0,0086-0,26 g IgG/l	20 µl	LC-V-Standard
NOR-Partigen-IgM	0.32-4.83 g IgM/l	5 µl	Ig/C3c-Standard
LC-Partigen-IgM	0.011-0.38 g IgM/l	20 µl	LC-A-Standard

Nach dem Auftragen der Proben und dreier verschiedener Standardlösungen auf die Platte wurde diese festverschlossen bei 20°C für zwei Tage horizontal gelagert. Nach dieser Zeit war der Diffusionsendpunkt erreicht. Die Durchmesser der entstandenen

Präzipitate wurden mit einer Spezienschablone (Fa. BEHRING) abgelesen. Anschließend wurden die quadrierten Durchmesser der Präzipitate der Standardlösungen als Funktion der bekannten Antigen-Konzentration linear aufgetragen, wobei eine Gerade resultierte. Schließlich wurden die Antigen-Konzentrationen der Proben an der Standardgerade abgelesen. Die Abbildung 3 zeigt eine solche Standardgerade.

Abbildung 3: Typische Standardgerade der radialen Immundiffusion



II.2.7 Bestimmung der humanen Auto-Antikörper gegen den Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) der inneren Mitochondrienmembran

II.2.7.1 Herkunft des ANT

Die Isolation des ANT aus Rinderherzen wurde nach der von Riccio et al. ^(104;105) beschriebenen Methode vorgenommen, der ANT freundlicherweise von Dr. Bayer, Institut für physikalische Chemie der Universität München, für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. ANT aus Rinderherzen konnte verwendet werden, da immunologische Untersuchungen keine Hinweise auf eine Speziespezifität, wohl aber auf eine Organspezifität ergaben ⁽¹⁰⁶⁾.

285 der 297 (= 97%) Aminosäuren des ANT aus Herzen von Rindern bzw. Menschen sind homolog ⁽¹⁰⁷⁾. Der isolierte ANT war in einem Stabilisierungspuffer (175mM Na₂SO₄, 10mM MOPS, 0,5-1% Triton X-100 (SIGMA) in dH₂O, pH=7,2) gelöst, der durch Mizellen-Bildung die Denaturierung des hydrophoben Proteins verhindert.

II.2.7.2 Bestimmung des ANT-Gehaltes in der ANT-Lösung

Die Konzentration an Protein im Puffer, die dem isolierten ANT entspricht, wurde mit der Methode nach LOWRY ⁽¹⁰⁸⁾ bestimmt. Es wurden dazu 100µl des ANT-Puffers mit 55 µl SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat 10% in dH₂O) in einem 1,5 ml Röhrchen (Fa. EPPENDORF) versetzt und 10 Minuten bei 20°C geschüttelt. Dann wurden 50 µl FOLIN-Reagenz zupipettiert und für 30 bis 60 Minuten auf einem Rüttler inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 750 nm erfolgte dann die photometrische Bestimmung der Stärke der Farbreaktion, die dem Proteingehalt proportional ist. Für jeden Versuch wurden Leerwerte und eine Verdünnungsreihe mit BSA (SIGMA)-Standards in bekannter, abgestufter Konzentration mitgeführt, mit deren Hilfe dann eine Standardkurve erstellt wurde. Die Protein-Konzentrationen der Proben wurden als Doppelwerte gemessen und die Werte gemittelt. Anhand der Standardkurve wurde dann die Proteinkonzentration der Proben abgelesen. In der beschriebenen Form hatte der Test eine Sensitivität von ca. 0,05 mg Protein/ml Puffer.

II.2.7.3 Bestimmung des Triton X-100-Gehaltes in der ANT-Lösung

Mit der von GAREWAL ⁽¹⁰⁹⁾ beschriebenen Methode wurde die Konzentration des Detergenz Triton X-100 bestimmt, das für die Micellen-Bildung und damit für die Solubilisierung des hydrophoben ANT (Membranprotein) verantwortlich ist. Sämtliche Messungen erfolgten in Ethanol 50%, so daß der ANT-Puffer vor Testeinsatz 1:1 mit absolutem Ethanol verdünnt wurde. Durchgeführt wurde der Test in 2ml-Röhrchen (Fa. EPPENDORF), in die 150µl des ANT-Puffers und 150µl des 100%igen Ethanols gefüllt wurden. Anschließend wurden 400µl des Ammonium-Cobalt-Thiocyanat(ACT)-Reagenz (178 g/l NH₄SCN, 28 g/l Co(NO₃)x6H₂O in dH₂O) hinzugegeben und das Röhrchen für 5 Minuten bei 20°C stehengelassen. Danach wurden 1,25 ml Ethylen-Dichlorid zugegeben und für zwei Minuten zur Vermischung der Phasen geschüttelt. Die Trennung der Phasen erfolgte durch zweiminütiges Zentrifugieren mit 200 g. Als nächstes wurde die untere Phase (mit dem Ethylen-Dichlorid) abgesaugt, in eine Küvette (Fa. KONTRON) gefüllt und photometrisch analysiert. Die Differenz der Extinktionen bei 622 nm und 678 nm war dabei dem Triton X-100-Gehalt in der Lösung proportional. Sämtliche Proben wurden als Doppelwerte gemessen und die Werte gemittelt. Für jede Versuchsreihe wurden Triton-Standards in bekannter, abgestufter Konzentration mitgeführt, anhand derer sich eine Standardkurve ergab. Die Triton X-100-Konzentrationen der Proben wurden an der Standardkurve abgelesen. In der hier beschriebenen Form hatte der Test eine Sensitivität von 0,04% Triton X-100.

II.2.7.4 Entfernung von überschüssigem Triton X-100 aus der ANT-Lösung

Die Konzentration an Triton X-100 im ANT-Puffer betrug bedingt durch die Isolierung 0,5 bis 1%. Da die untere micellare Konzentration an Triton X-100 auf der anderen Seite nur ca. 0,017% ⁽¹¹⁰⁾ beträgt, um den ANT in Lösung zu halten und die Antikörperbindung an den ANT jedoch durch ein Übermaß an Triton X-100 behindert wird, wurde überschüssiges Triton X-100 mit der Methode nach HOLLOWAY ⁽¹¹⁰⁾ entfernt, um die Bindung der humanen Autoantikörper an den ANT zu optimieren. Dazu wird das Triton X-100 an Mikrosphären- Kügelchen, „Bio-Beads SM-2“,

adsorbiert (Fa. BIORAD). Vor Ihrem Einsatz müssen die Bio-Beads zuerst durch mehrfaches Waschen in reinem Methanol aktiviert werden (5g Bio-Beads auf 35 ml Methanol in einem 50ml-Röhrchen). Dazwischen wird kurz zentrifugiert und der Methanol-Überstand abgesaugt. Nach erneutem Zentrifugieren werden die Bio-Beads mit dH₂O gereinigt, um eine Verunreinigung des ANT-Puffers zu verhindern. Die Kapazität der Bio-Beads betrug 0.05 g Triton X-100/g feuchte Beads. Dann wurde die Menge der Bio-Beads berechnet, die zur Absenkung der Triton-Konzentration auf 0,1% erforderlich ist. Die Proben wurden zur Entfernung des Tritons zwei Stunden bei 4°C auf einem Rüttler inkubiert, wobei die Bio-Beads eine Ihrer Kapazität entsprechende Menge an Triton X-100 binden. Nach der Inkubation wurde der Triton-Gehalt im ANT-Puffer erneut gemessen (siehe II.2.8.3) und gegebenenfalls nochmals Bio-Beads zugegeben, um die Triton-Konzentration auf 0,1% zu senken. Nach dem Erreichen einer Triton-Konzentration von 0,1% wurde die Protein-Konzentration im Überstand erneut bestimmt (siehe II.2.8.2), um ein Ausfallen des Proteins (Verminderung der Protein-Konzentration im Verlaufe der Triton-Entfernung) erkennen zu können. Beim Arbeiten mit dieser Methode trat dies jedoch nicht auf. Die ANT-Konzentration wurde anschließend mit ANT-Puffer auf 0,25 mg/ml eingestellt.

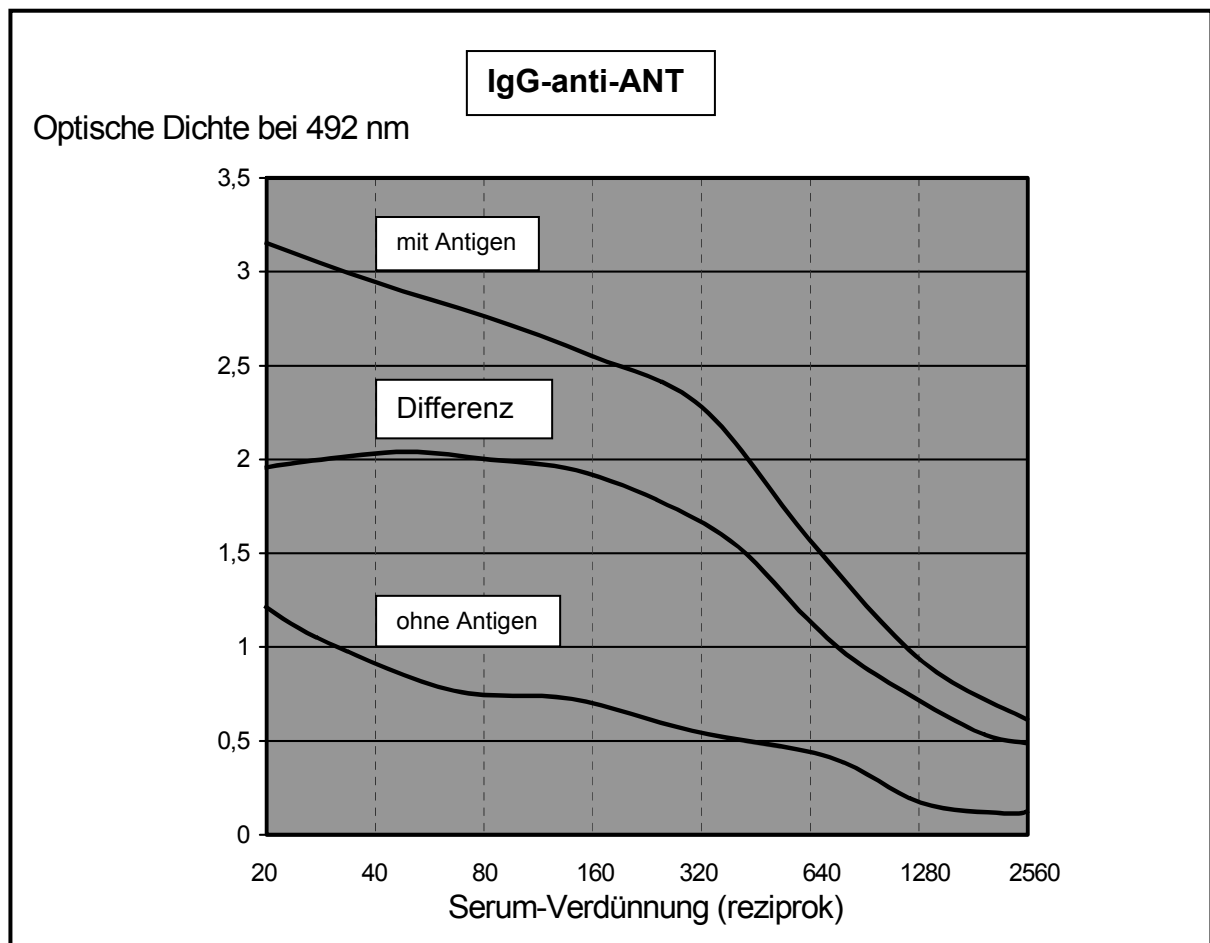
II.2.7.5 Humaner ANT-Autoantikörper-ELISA

Nach dem Prinzip eines Enzym-Immuno-Assay (ELISA) erfolgte die Bestimmung der humanen Autoantikörper im Serum der Blutspender bzw. im Serum der SCID-Maus 60 Tage nach Transfer. Die Methode lehnte sich an einen Radio-Immuno-Assay (RIA) an, der bereits früher beschrieben worden war⁽¹¹¹⁾. Es ergaben sich Abweichungen durch Vorversuche, in denen die Testbedingungen für den ELISA optimiert wurden. Sämtliche Inkubationen wurden bei 4°C durchgeführt, um eine Denaturierung zu verhindern. Es wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten aus Polystyrol (Fa. NUNC) zunächst mit 110µl ANT-Lösung (0.25mg ANT/ml, 0,1% Triton X-100) als Antigen pro Vertiefung über Nacht inkubiert, danach wurde das Antigen wieder eingesammelt und freie Bindungsstellen auf der Platte mit Blockierungspuffer, bestehend aus Magermilchpulver 2%, Tween 20 0,05% in PBS (10mM, pH=7,2),

150µl pro Vertiefung, blockiert. Die Platten wurden dann nach zwei Stunden Inkubation ausgeschüttet und die Seren der Blutspender bzw. der SCID-Maus 60 Tage post Transfer zugegeben. Die Kontroll- und Patientenserum wurden 1:20 als Ausgangsverdünnung und dann konsekutiv 1:2 bis zu einer Endverdünnung von 1:2560 mit Blockierungspuffer verdünnt, die SCID-Mausserum wurden 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 in Blockierungspuffer verdünnt. Als Leerwert wurde auf jeder Platte PBS und als Positiv-Kontrolle ein humanes Serum mit einem hohen IgG-Titer gegen den ANT mitgeführt. Jedes Serum wurde auf derselben Platte, jeweils in Doppelbestimmungen, sowohl gegen den ANT als Antigen als auch gegen die Platte und den Blockierungspuffer alleine getestet, um gegen Platte oder Blockierungspuffer gerichtete unspezifische Bindungen erkennen zu können. In jede Vertiefung wurden 100µl der Serumlösungen gegeben und dann 18 Stunden lang inkubiert. Danach wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen, jeweils 300µl pro Vertiefung, und anschließend der zweite Antikörper, 1:5000 in Blockierungspuffer verdünnt, zugegeben. Für den Nachweis von an den ANT gebundenen humanen Antikörpern vom IgG-Isotyp kam ein POD-gekoppeltes, polyklonales Ziege-anti-Human IgG, Fc-spezifisches Antiserum (DIANOVA) zur Anwendung, das gegen Mausimmunglobuline präadsorbiert war. So konnte eine Kreuzreaktivität mit eventuell gebundenem Maus-IgG ausgeschlossen werden. Es wurde vier Stunden lang mit je 100µl pro Vertiefung inkubiert. Danach wurde erneut gewaschen und anschließend die Substrat-Lösung (Zitronensäure (SIGMA) 10g/l, Na₂HPO₄ 14g/l, O-Phenyldiamin (OPD)(SIGMA) 400mg/l, H₂O₂ 328µl/l in dH₂O), 100µl pro Vertiefung, zugegeben und im Dunkeln bei 20°C für 30 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit H₂O₂ gestoppt und dann die Extinktion bei 492 nm gemessen. Die Doppelwerte wurden zur Auswertung gemittelt und die Werte für die Reaktion gegen Platte und Blockierungspuffer von den Werten für die Reaktion gegen den ANT abgezogen. So ergaben sich als Differenz die Werte für die eigentliche Bindung der humanen Antikörper gegen den ANT, unabhängig von unspezifischen Reaktionen. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden war diese Art der Auswertung erforderlich, da die Seren teilweise eine erhebliche unspezifische Bindung an die Platte und den Blockierungspuffer zeigten. Eine typische Kurve, die durch graphisches Auftragen der Extinktion gegen die Serumverdünnung entsteht, ist in

Abbildung 4 dargestellt. Dabei handelt es sich um das Serum von Patient D. Bei den Seren der Patienten wurde die Titerhöhe als diejenige Serumverdünnung definiert, bei der die Bindung an den ANT gleich hoch war wie in der Ausgangsverdünnung (1:20) der herzgesunden Kontrollen. Es handelte sich dabei um eine semiquantitative Bestimmung.

Abbildung 4: Humaner ANT-Autoantikörper-ELISA mit dem Serum von Patient D. Dargestellt sind die für IgG-anti ANT ermittelten Reaktionen des Serums bei verschiedenen Verdünnungen mit und ohne ANT-Antigen. Zur Berechnung der Titerhöhe diente die sich daraus ergebende Differenz.



II.2.8 Ermittlung der hämodynamischen Daten der Tierherzen

II.2.8.1 Vorbereitung der Tiere

60 Tage nach Transfer der humanen Zellen in die SCID-Mäuse wurden diese mit Chloralhydrat/Ether narkotisiert und auf einer für derartige Versuche an Kleintieren speziell entwickelten Metallplatte an den Extremitäten fixiert. Die Temperatur der Platte wurde auf konstant 38°C gehalten. Die Temperatur der umgebenden Luft wurde durch eine Infrarotlampe ebenfalls auf konstant 38°C gehalten.

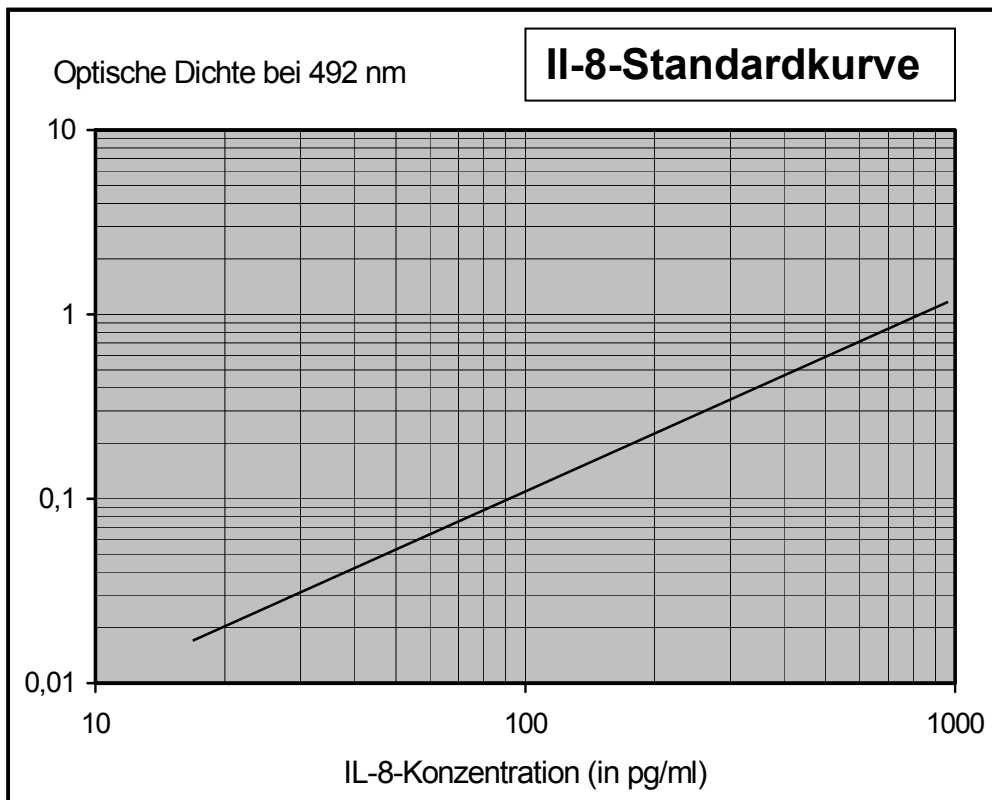
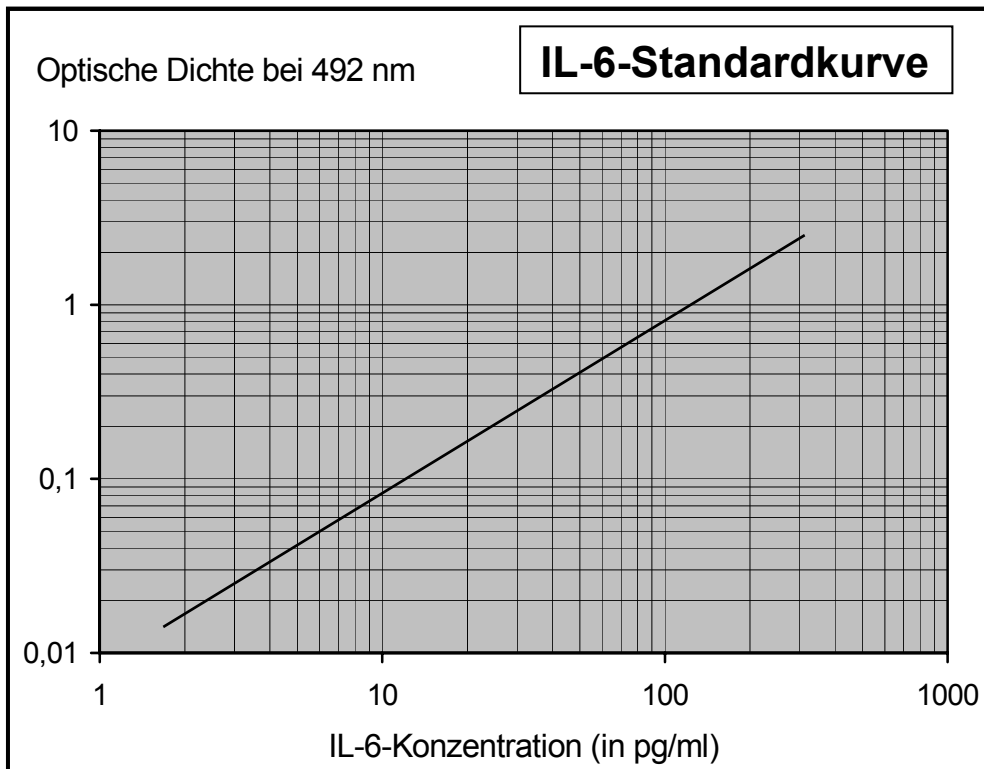
II.2.8.2 Versuchsanordnung und Auswahl der Parameter

Nach Fixation der Tiere auf der Metallplatte wurde innerhalb weniger Sekunden der Thorax eröffnet und der linke Ventrikel mit einer Stahlkanüle (20G) punktiert. Die Kanüle war komplett mit Wasser gefüllt und direkt mit einem Druckaufnehmer (STATHAM P23DB, Fa. GOULD, Mass., USA) verbunden. Das so gewonnene Signal des linksventrikulären Druckes wurde über einen Verstärker (DC Bridge Amplifier 660, HUGO SACHS Elektronik, Freiburg) für 10-15 Sekunden mit Hilfe eines Schreibers (WR 3101 Linearrecorder Mark VII, GRAPHTEC Corp., Tokyo, Japan) aufgezeichnet; der Papiervorschub betrug 250mm/Sekunde. Die Herzfrequenz wurde mit Hilfe eines entsprechenden Moduls (Typ HRM 669, HUGO SACHS Elektronik) über die phasischen Drucksignale ermittelt. Ein Differentiator (Typ SQC 575, HUGO SACHS Elektronik) lieferte die Kontraktilität (dP/dt in mmHg/sec.) als zweite Ableitung des Drucksignals⁽¹²¹⁾. Bei allen Experimenten waren Herzfrequenzen und Ventrikeldrücke für mindestens 15 Sekunden nach Punktion des linken Ventrikels stabil.

II.2.9 Quantitative Bestimmung der humanen Interleukine 6 und 8

Für die quantitative Bestimmung der humanen Interleukine 6 und 8 im Serum der Spender und im Serum der Mäuse 60 Tage post Transfer wurden zwei komplette Testsysteme (QUANTIKINE, Fa. R&D SYSTEMS) verwendet, welche auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA beruhen. Die zu untersuchenden Proben und die vorgegebenen Standards wurden in die dafür vorgesehenen Vertiefungen der zum jeweiligen Testkit gehörigen Microtiter-Platte pipettiert. Der wandständige Antikörper bindet die in den Proben und den mitgeführten Standards enthaltenen Interleukine. Nach dem Entfernen des Serums und dem mehrfachen Waschen der Vertiefungen, um eventuell noch vorhandene Proteine zu beseitigen, wird ein polyklonaler, Enzym-konjugierter Antikörper zugegeben, der wiederum an die immobilisierten Interleukine aus dem ersten Inkubationsschritt bindet. Danach wird wieder gewaschen, um ungebundene, Enzym-konjugierte Antikörper zu entfernen. Es bestand keine Kreuzreaktivität, wie entsprechende Vorversuche zeigten. Anschließend erfolgt die Zugabe der Substratlösung. Die Entwicklung der Farbe wird gestoppt und deren Intensität gemessen. Das im Komplex gebundene Enzym und damit auch die Farbentwicklung ist der Konzentration der humanen Interleukine proportional. Durch Standards mit bekannten IL-Konzentrationen wurden zwei Standardgeraden erstellt, an denen die Konzentrationen der humanen Interleukine 6 und 8 in den Proben abgelesen wurden. Die Test-Kits wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet und zeigten eine Sensitivität von 0,70 pg/ml für IL-6 und 10 pg/ml für IL-8. Die Abbildung 6 zeigt zwei solche Standardgeraden.

Abbildung 6: Typische Standardgeraden für die quantitative Bestimmung der humanen Interleukine 6 und 8.



II.2.10 Quantitative Bestimmung des humanen löslichen Interleukin 2-Rezeptors (sIL-2-R)

Um den humanen löslichen Interleukin-2-Rezeptor im Serum der Blutspender bzw. im Serum der SCID-Maus 60 Tage nach Transfer quantitativ zu bestimmen, wurde ein komplettes Testsystem (Fa. BOEHRINGER, Mannheim) verwendet, das ebenfalls auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA beruht. Es wurde dabei in der Probe enthaltener sIL-2-R in einem Inkubationsschritt vom Wandantikörper und dem POD-konjugierten Detektionsantikörper gebunden. Die beiden monoklonalen Antikörper aus Maus erkennen unterschiedliche Epitope des humanen sIL-2-R, wobei der Fangantikörper ein Epitop nahe der IL-2-Bindungsstelle erkennt und nur an biologisch aktiven humanen sIL-2-R bindet. Wie entsprechende Vorversuche wiederum zeigten, bestand keine Kreuzreaktivität mit Mausserum, die Antikörper waren speziesspezifisch. Die im Komplex gebundene POD und damit auch die Farbentwicklung ist der Konzentration an humanem sIL-2-R proportional. Anhand einer Standardkurve, die durch Standards mit bekannter sIL-2-R-Konzentration erstellt wurde, konnte die Konzentration des humanen sIL-2-R in den Proben abgelesen werden. Die Verwendung des Test-Kits erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers und zeigte eine Sensitivität von 5 pmol/l sIL-2-R.

II.2.11 Immunhistologie

Nach der Präparation wurden die Organe der SCID-Mäuse für die immunhistologische Untersuchung von humanen lymphozytären Infiltraten in Herz, Skelettmuskulatur, Leber, Niere und Milz 60 Tage post Transfer in OCT-Gewebekleber (MILES, Elkhart, USA) auf einer Korkscheibe eingebettet und in 2-Methylbutan, das durch flüssigen Stickstoff gekühlt wurde, eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80°C. Es wurden dann 5µm dicke Schnitte in einem Kryotom bei -20°C gefertigt und diese anschließend auf einem Objektträger zehn Minuten bei 4°C in Azeton fixiert. Danach wurden 80 – 150 µl des ersten Antikörpers, verdünnt in PBS/5% FCS, zugegeben und für 45 Minuten bei 20°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind in

Tabelle 4 aufgeführt. Die Antikörper zeigten keine Kreuzreaktion mit Maus-Antigenen, wie entsprechende Vorversuche zeigten. Nach zweimaligem Waschen der Objektträger in PBS für je fünf Minuten auf einem Rüttler wurden für die indirekte immunhistologische Markierung 80-150µl des zweiten Antikörpers, ein polyklonales Kaninchen-anti-Maus-IgG (H+L), POD-konjugiertes Antiserum (DIANOVA), präadsorbiert gegen humane Immunglobuline, 5µg/ml in PBS/20% FCS, zugegeben und für weitere 45 Minuten bei 20°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es bestand keine Kreuzreaktivität mit dem Herz- und Skelettmuskelgewebe, dem Leber- und Nierengewebe aus Mäusen vom „non-leaky“-Phänotyp. Lediglich mit der Milz, selbst aus Mäusen vom „non-leaky“-Phänotyp (Maus-IgG im Serum <0,5µg/ml), zeigte sich eine geringe Kreuzreaktion, was auf das Vorhandensein vereinzelter Plasmazellen im Gewebe zurückzuführen ist und in der Literatur beschrieben ist⁽¹¹²⁾. Die Objektträger wurden erneut gewaschen und dann in eine Küvette mit Substratlösung (0,14 mg/ml 3-Amino-9-Ethylcarbazol (SIGMA), 0,003% H₂O₂, 5% N,N-Dimethylformamid, 0,035 mM Na-Acetat, 0,015 mM Essigsäure) gestellt und für 12 Minuten bei 20°C auf einem Rüttler im Dunkeln inkubiert. Die Objektträger wurden danach wieder gewaschen und anschließend mit Mayer`s-Hämalaun für fünf Minuten gegengefärbt. Es folgte ein Bläuen/Entfärben unter H₂O für sechs Minuten und das Aufbringen der Deckgläser mit KAISER-Glycerolgelatine. Die Auswertung erfolgte unter einem binokularen Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung, wobei für jeden Antikörper 100 Gesichtsfelder ausgezählt wurden. Die Ergebnisse wurden als Durchschnittswerte pro 10 Gesichtsfelder angegeben. Färbungen mit <0,7 positive Zellen / 10 Gesichtsfelder wurden als negativ angesehen.

Tabelle 4: Antikörper für die Immunhistologie				
Erstantikörper	Spezifität	Bezugsquelle	Einsatzkonzentration	Zweitantikörper
<i>Maus-anti CD 45, human</i>	Humane Leukozyten Hamburg	DAKO,	240 µg/ml	Kaninchen-anti-Maus-IgG, POD-konjugiert
<i>Maus-anti CD 2, human</i>	Humane T-Lymphozyten	DAKO	155 µg/ml	dto.
<i>Maus-anti CD 3, human</i>	Reife humane T- Lymphozyten	DAKO	155 µg/ml	dto.
<i>Maus-anti CD 4, human</i>	Humane T-Helfer- Lymphozyten	COULTER, Krefeld	50 µg/ml	dto.
<i>Maus-anti CD 8, human</i>	Humane zytotoxische/ Suppressor-T-Lymphozyten	COULTER	50 µg/ml	dto.
<i>Maus-anti CD 11b, human</i>	Makrophagen, Monozyten, Granulozyten	DIANOVA,, Hamburg	75 µg/ml	dto.
<i>Ziege-anti Human IgG (Fc-spezifisch), POD-konjugiert</i>	Human – IgG	DIANOVA		
<i>Ziege-anti Human IgM (Fc-Spezifisch), POD-konjugiert</i>	Human - IgM	DIANOVA		

II.2.12 Gewichtsbestimmung der Mäuseherzen

Nach Ermittlung der hämodynamischen Parameter und Ausbluten der SCID-Mäuse wurden vor Weiterverarbeitung der Organe zwecks histologischer Aufarbeitung die Gewichte der Tierherzen bestimmt. Dazu wurden vorher unter einem Vergrößerungsglas mit mikrochirurgischen Werkzeugen die zu- bzw. wegführenden Gefäße auf Vorhofniveau bzw. auf Klappenniveau von den Herzen getrennt und die Gewichte dann mit Hilfe einer entsprechenden Laborwaage auf 1mg genau ermittelt.

II.2.13 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Gemäß der Definition wurden die Mittelwerte, soweit angegeben, als Summe aller Beobachtungen, geteilt durch die Anzahl der Beobachtungen, errechnet. Als charakteristische Werte für die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert bzw. bei Betrachtung des arithmetischen Mittelwertes selbst als Zufallsvariable wurden die Standardabweichung bzw. die Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes berechnet. Sie sind gleich der Wurzel aus der Summe der Fehlerquadrate dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen bzw. gleich der Wurzel aus der Summe der Fehlerquadrate dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen und nochmals dividiert durch die Wurzel der Anzahl der Beobachtungen. Für die Untersuchung der Ergebnisse von zwei unabhängigen Kollektiven mit quantitativen Merkmalen auf statistische Signifikanz wurde zunächst ein Vortest auf Normalverteilung der Stichproben, der Test nach David, Pearson und Stephens, und ein Test auf gleiche Varianz der Stichproben, der F-Test, durchgeführt. Lag eine Normalverteilung und gleiche Varianz der beiden Kollektive vor, so wurde der t-Test nach Student angewandt. Lagen zwei unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz oder nicht normalverteilten Werten vor, so wurde mit dem Test nach Wilcoxon auf Signifikanz geprüft. Für den Vergleich zweier unabhängiger Häufigkeitsverteilungen (keine quantitativen Merkmale) wurde der χ^2 -Vierfeldertafel-Test verwendet. Um eine lineare Abhängigkeit von zwei quantitativen Größen zu überprüfen, berechneten wir den Korrelationskoeffizienten. Wie allgemein üblich wurde ein $p > 0,05$ als nicht signifikant bezeichnet ^(113;114).