

### III. Ergebnisse

**Tabelle 5:** Screening-Daten der erkrankten Spender

Spender	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<b>humoral</b>									
<i>IgG</i> (in g/l)	13,20	11,26	8,45	10,88	10,72	9,25	8,89	10,46	9,20
<i>IgM</i> (in g/l)	2,78	1,50	1,69	2,36	2,85	1,10	1,52	2,40	2,36
<i>IL-6</i> (in pg/ml)	12,30	6,90	36,00	10,10	72,50	8,20	14,50	31,00	8,40
<i>IL-8</i> (in pg/ml)	87	53	280	23	110	<10	150	75	17
<i>sIL-2-R</i> (in pmol/l)	186	43	146	80	135	78	170	130	102
<i>EBV-Serologie</i>	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>IgG-anti ANT</i> (Titer)	1:640	1:160	1:1280	1:320	1:320	1:640	1:320	1:640	1:160
<b>zellulär (in %)</b>									
<i>CD3<sup>+</sup>-Zellen</i>	69,63	91,03	86,69	78,43	86,59	93,41	93,54	65,12	84,74
<i>CD19<sup>+</sup>-Zellen</i>	8,17	4,94	3,43	9,25	9,14	4,09	3,84	13,05	9,33
<i>CD4<sup>+</sup>-Zellen</i>	48,21	67,26	45,28	55,77	69,46	69,34	81,82	34,22	72,16
<i>CD8<sup>+</sup>-Zellen</i>	34,79	23,81	44,62	22,45	17,62	21,47	11,61	36,61	12,85
<i>CD45RO<sup>+</sup>-Zellen</i>	25,98	15,85	31,17	55,96	11,85	26,88	23,59	59,39	26,79
<i>CD25<sup>+</sup>-Zellen</i>	4,51	10,85	22,67	9,90	8,16	3,05	17,11	8,20	6,91
<i>CD57<sup>+</sup>-Zellen</i>	11,30	5,11	13,04	9,26	5,49	12,33	2,21	11,60	2,68
<i>CD14<sup>+</sup>-Zellen</i>	16,44	1,31	1,19	0,33	0,62	0,30	0,81	0,61	0,59
<i>HLA-DR</i>	8,17	5,54	10,74	14,84	7,72	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
(n.b. = nicht bestimmt)									

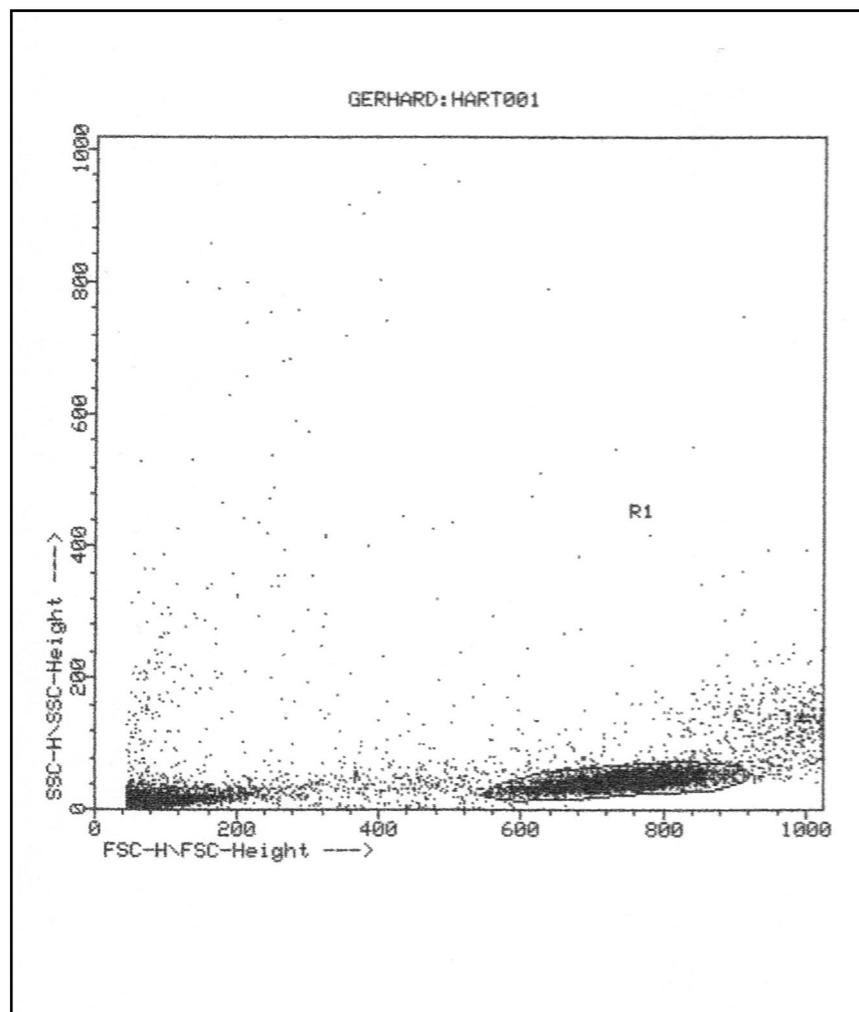
Spender	J	K	L	M
<b>humoral</b>				
<i>IgG</i> (in g/l)	10,43	13,65	10,80	9,26
<i>IgM</i> (in g/l)	1,85	1,68	2,36	1,55
<i>IL-6</i> (in pg/ml)	5,20	14,00	9,30	3,10
<i>IL-8</i> (in pg/ml)	29	14	<10	52
<i>sIL-2-R</i> (in pmol/l)	73	128	55	87
<i>EBV-Serologie</i>	neg.	grenzw.	neg.	neg.
<i>IgG-anti ANT</i> (Titer)	neg.	neg.	neg.	neg.
<b>zellulär</b>				
<i>CD3<sup>+</sup>-Zellen</i>	89,84	78,60	71,17	55,88
<i>CD19<sup>+</sup>-Zellen</i>	4,43	7,82	10,69	16,63
<i>CD4<sup>+</sup>-Zellen</i>	77,99	59,65	42,56	15,50
<i>CD8<sup>+</sup>-Zellen</i>	14,66	21,30	34,89	51,46
<i>CD45<sup>+</sup>-Zellen</i>	15,73	11,76	6,79	23,42
<i>CD25<sup>+</sup>-Zellen</i>	3,02	n.b.	n.b.	n.b.
<i>CD57<sup>+</sup>-Zellen</i>	2,16	4,81	14,80	17,97
<i>CD14<sup>+</sup>-Zellen</i>	0,39	0,37	1,01	10,28
<i>HLA-DR</i>	n.b.	2,12	9,60	n.b.

**Tabelle 6:** Screening-Daten der gesunden Spender.

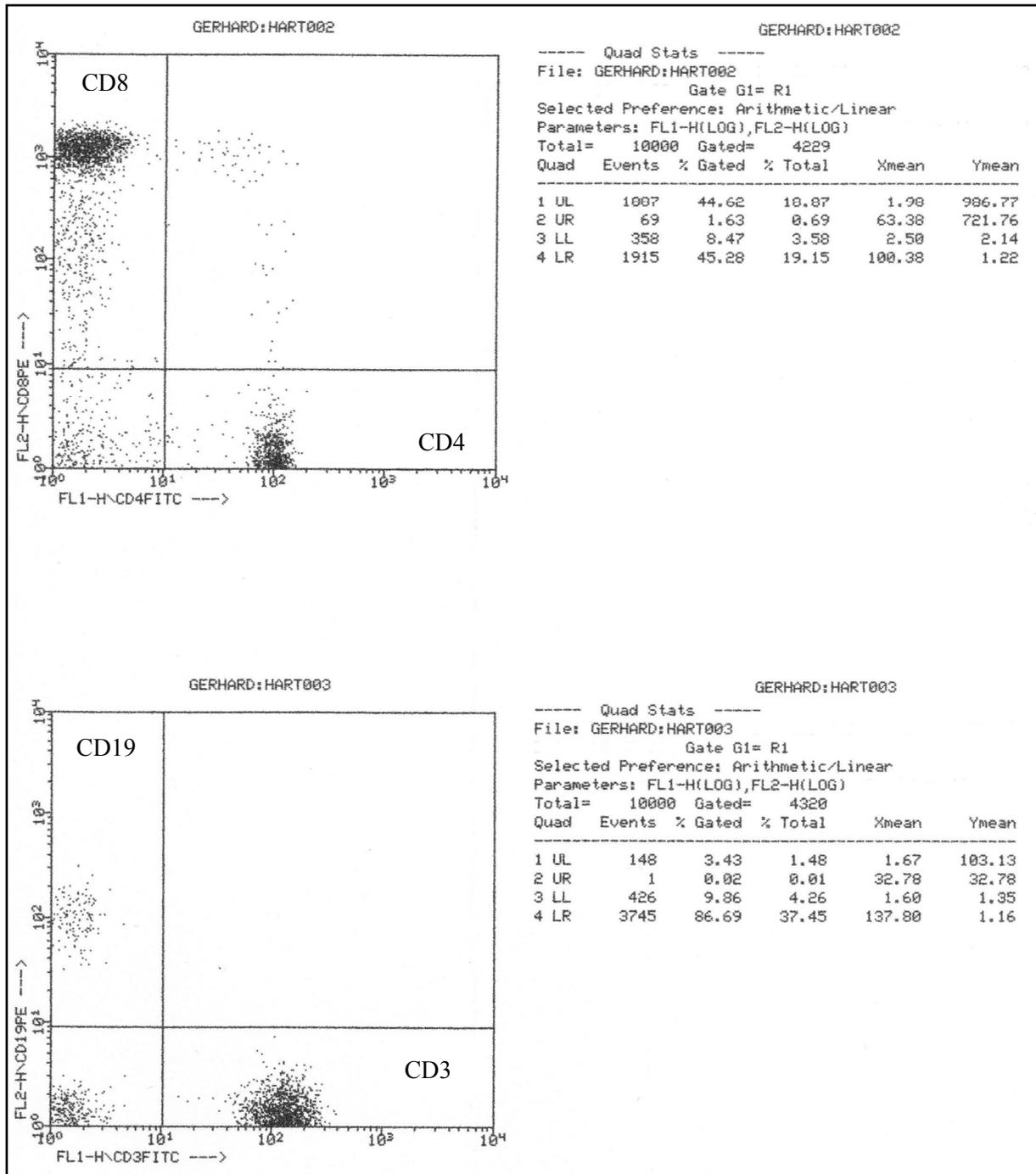
### III.1 Screening der kranken und gesunden Spender

Für die Auswahl von geeigneten Spendern für den Transfer ihrer peripheren Blutlymphozyten in SCID-Mäuse sowie für den Vergleich der Werte aus den SCID-hu-PBL-Seren mit den Seren der Spender wurde ein Screening durchgeführt, das die in den Tabellen 5 und 6 aufgeführten humoralen und zellulären Parameter des Immunsystems umfaßt. Für das Gesamt-IgG, das Gesamt-IgM, die EBV-Serologie und die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen ergaben sich erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Spendern. Die erkrankten Spender zeigten einen hohen IgG-Autoantikörpertiter gegen den ANT (mit

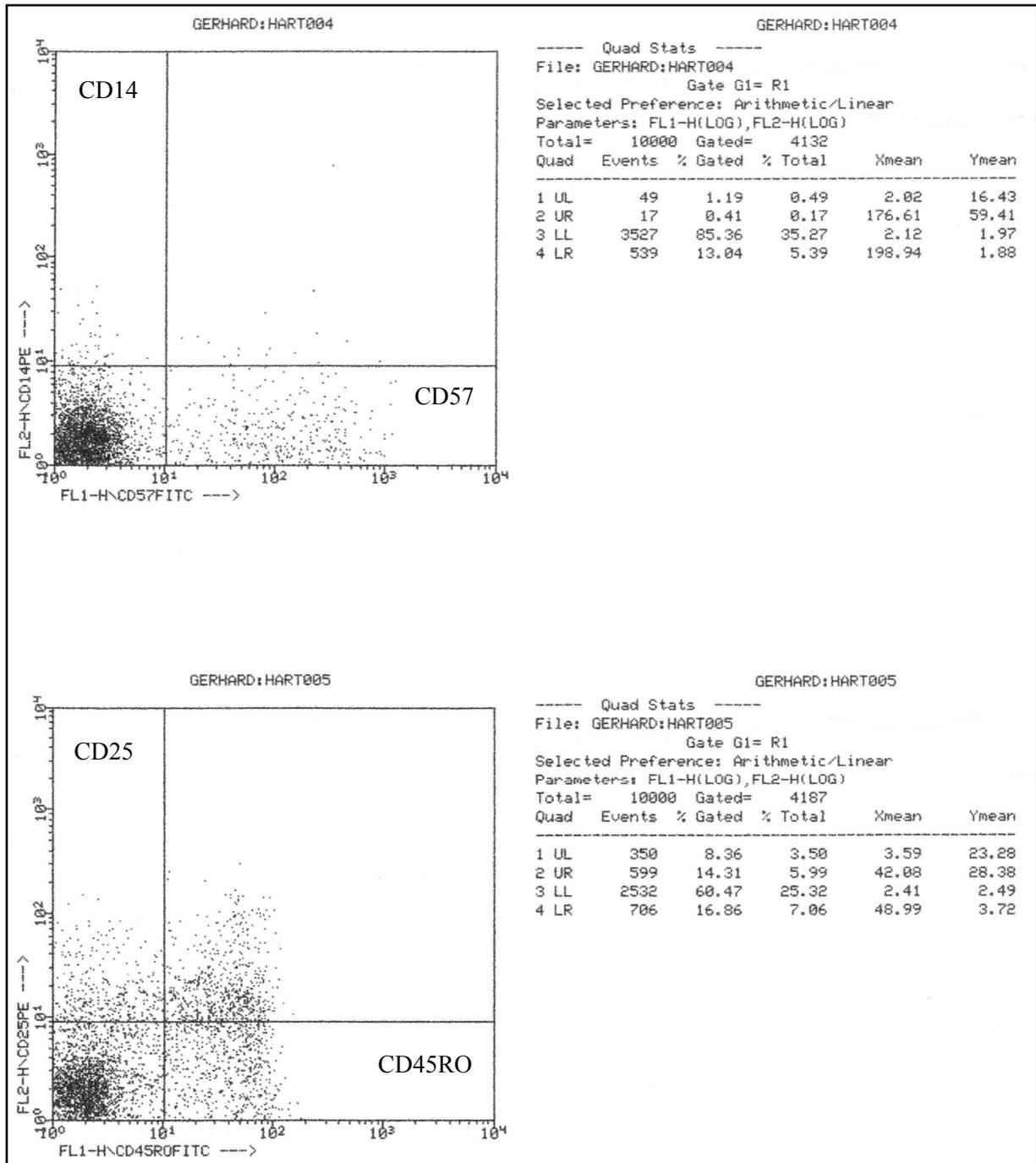
Werten größer oder gleich 1:160), die Kontrollen dagegen keine Bindung an den ANT im ELISA. Ferner fallen bei den Patienten, nicht jedoch bei den Kontrollen, die erhöhten Spiegel an Interleukin 6 und 8, sowie an löslichem Interleukin-2-Rezeptor auf. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Durchschnittswerte der humoralen Parameter der gesunden und erkrankten Spender, die Abbildungen 7a-d zeigen exemplarisch die FACS-Protokolle des erkrankten Patienten C.



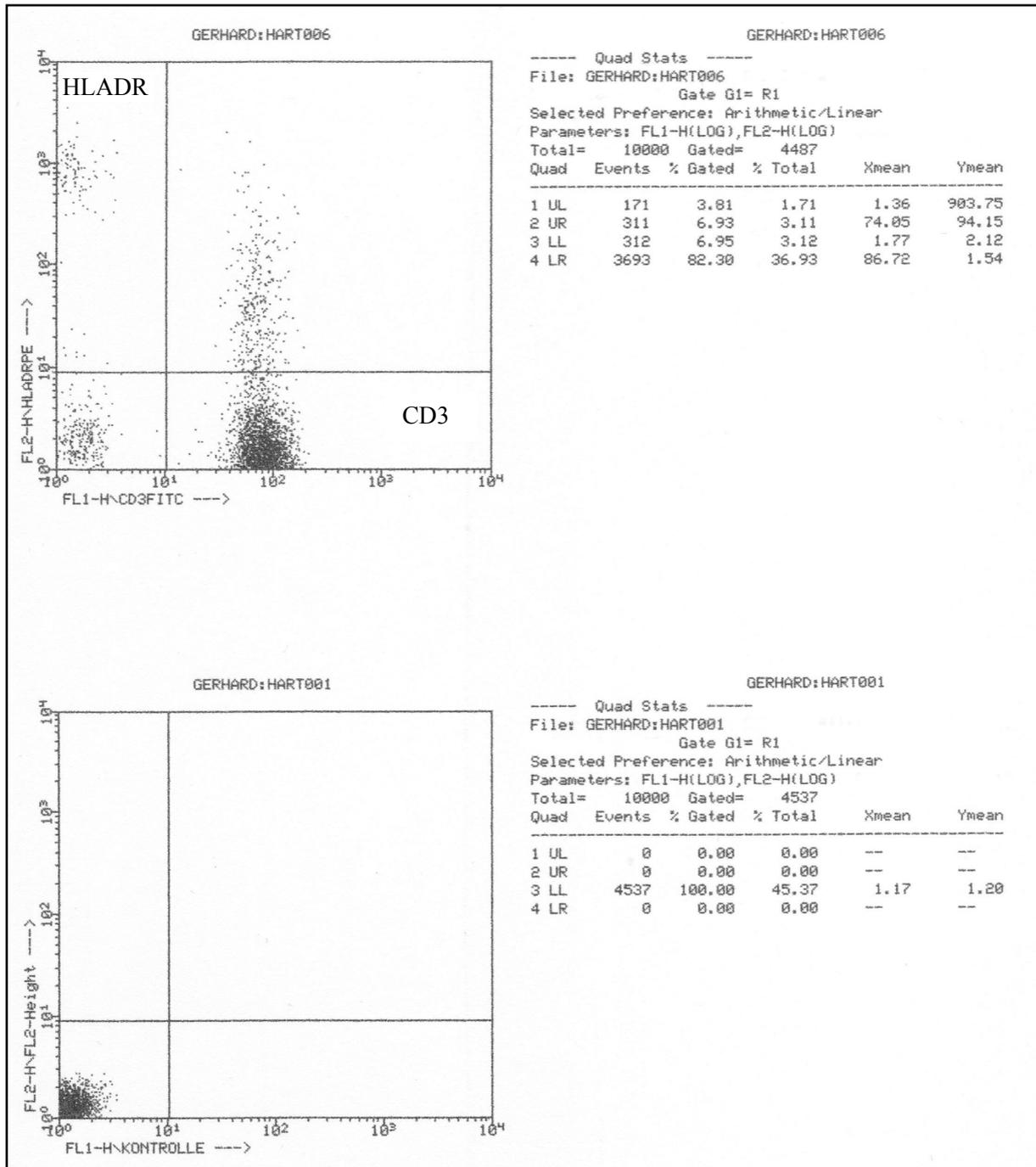
**Abbildung 7a:** FACS-Protokolle des erkrankten Patienten C. Auswertung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut vor dem Transfer. Dargestellt sind das „gating“ (Abgrenzung der PBMC von anderen Zellen) und die nachfolgenden Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen bzw. -Einzelmarkierungen. Bei den nachfolgend dargestellten Markierungen wurden nur Zellen analysiert, die sich im PBMC-Gate befanden (Fortsetzung auf den folgenden Seiten).



**Abbildung 7b:** FACS-Protokolle des erkrankten Patienten C. Dargestellt sind Die Doppelmarkierungen CD4/CD8 und CD3/CD19.



**Abbildung 7c:** FACS-Protokolle des erkrankten Patienten C. Dargestellt sind die Einzelmarkierungen CD14, CD25, CD45RO und CD57.



**Abbildung 7d:** FACS-Protokolle des erkrankten Patienten C. Dargestellt sind die Einzelmarkierungen HLA-DR und CD3 sowie die Negativkontrolle.

**Tabelle 7:** Durchschnittswerte der humoralen Parameter im Serum der gesunden und erkrankten Spender.

	Gesunde Spender		Erkrankte Spender	
<i>Immunglobulin G</i> (in g/l)	11,04	(9,26-13,65)	10,26	(8,45-13,20)
<i>Immunglobulin M</i> (in g/l)	1,86	(1,55-2,86)	2,06	(1,10-2,78)
<i>Interleukin-6</i> (in pg/ml)	7,9	(3,1-14,0)	22,2	(6,9-72,5)
<i>Interleukin-8</i> (in pg/ml)	26,2	(10,0-52,0)	89,4	(10,0-280,0)
<i>Solubler IL-2-Rezeptor</i> (in pmol/l)	88,25	(55,0-128,0)	118,0	(43,0-186,0)

### III.2 Mortalität in den Mäusen nach dem Transfer von humanen PBL`s

Es wurden ausschließlich „non-leaky“-Tiere mit einem Maus-IgG-Spiegel von <0,5µg/ml für den Transfer von humanen PBL`s verwendet (siehe II.2.2). Von 35 Tieren, denen humane PBL`s injiziert worden waren, überlebten 34 Stück die 60 Tage nach Rekonstitution. Lediglich ein Tier überlebte die erste Woche nicht. Keines der Tiere zeigte während dieser Zeit klinische Zeichen einer Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD), wie zum Beispiel Zehenspitzennekrosen, ein rauhes und lichtetes Fell oder eine Diarrhöe. Von den 12 Kontroll-Mäusen, denen keine PBL`s injiziert worden waren, starb ebenfalls ein Tier am Beginn der zweiten Woche.

### III.3 Humorale Parameter in der SCID-hu-PBL-Maus

60 Tage nach Transfer wurden im Serum der SCID-Maus die humanen Immunglobuline der Klassen G und M, der humane sIL-2-Rezeptor, die Interleukine 6 und 8 und die humanen Autoantikörper gegen den ANT bestimmt, um das Ausmaß der Rekonstitution mit humanen Zellen zu bestimmen. Tiere, die mit PBL`s von erkrankten Spendern rekonstituiert worden waren, wurden im Folgenden kurz als "Inf-KMP-PBLs" und Tiere, die mit PBL`s von gesunden Spendern rekonstituiert worden waren kurz als "Kontroll-PBLs" bezeichnet.

**Tabelle 8:** Humorale Parameter der SCID-hu-PBL-Maus 60 Tage nach Transfer

SCID-Mäuse mit		Hu-IgG in mg/l	Hu-IgM in mg/l	Hu-IL-6 in pg/ml	Hu-IL-8 in pg/ml	Hu-sIL-2R in pmol/l	Hu-IgG-anti- ANT (O.D.)
Kontroll-PBLs	1	2400	425	3.0	85	34	0.030
Kontroll-PBLs	2	2175	325	0	60	18	0.110
Kontroll-PBLs	3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0.042
Kontroll-PBLs	4	2650	425	0	n.b.	n.b.	0.067
Kontroll-PBLs	5	2175	1775	3.0	66	14	0.072
Kontroll-PBLs	6	1875	375	n.b.	65	46	0.015
Kontroll-PBLs	7	1325	0	n.b.	n.b.	20	0.014
Kontroll-PBLs	8	1275	200	6.5	n.b.	44	0
Kontroll-PBLs	9	1375	530	3.6	62	0	0.080
Kontroll-PBLs	10	1025	25	5.1	53	15	0.005
Kontroll-PBLs	11	1375	200	4.4	n.b.	0	0.038
Inf-KMP-PBLs	1	2325	1050	3.6	110	98	0.198
Inf-KMP-PBLs	2	100	750	7.0	42	90	0.072
Inf-KMP-PBLs	3	n.b.	n.b.	7.0	92	68	0.158
Inf-KMP-PBLs	4	3325	2250	3.0	n.b.	n.b.	n.b.
Inf-KMP-PBLs	5	1300	550	0	0	55	0.110
Inf-KMP-PBLs	6	1125	1225	7.5	42	160	0.216
Inf-KMP-PBLs	7	2475	1775	7.0	55	112	0.147
Inf-KMP-PBLs	8	950	750	n.b.	n.b.	66	0.120
Inf-KMP-PBLs	9	2025	275	0	85	64	0.196
Inf-KMP-PBLs	10	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Inf-KMP-PBLs	11	3700	1775	16.0	n.b.	146	0.205
Inf-KMP-PBLs	12	350	75	27.0	110	193	0.188
Inf-KMP-PBLs	13	350	125	7.0	97	37	0.085
Inf-KMP-PBLs	14	1950	1325	8.5	92	81	0.123
Inf-KMP-PBLs	15	675	225	6.5	100	65	0.220
Inf-KMP-PBLs	16	1175	950	3.5	85	58	0.074
Inf-KMP-PBLs	17	1875	1275	5.5	97	96	0.132
Inf-KMP-PBLs	18	400	50	7.4	n.b.	n.b.	0.105
Inf-KMP-PBLs	19	3475	2050	12.0	125	160	0.123
Inf-KMP-PBLs	20	1450	1175	n.b.	92	210	n.b.
Inf-KMP-PBLs	21	3925	2590	n.b.	n.b.	130	0.231
Inf-KMP-PBLs	22	1375	1050	0	n.b.	114	n.b.
Inf-KMP-PBLs	23	2325	775	5.0	140	245	0.185

„n.b.“ bedeutet hier: nicht bestimmt wegen Mangel an Serum

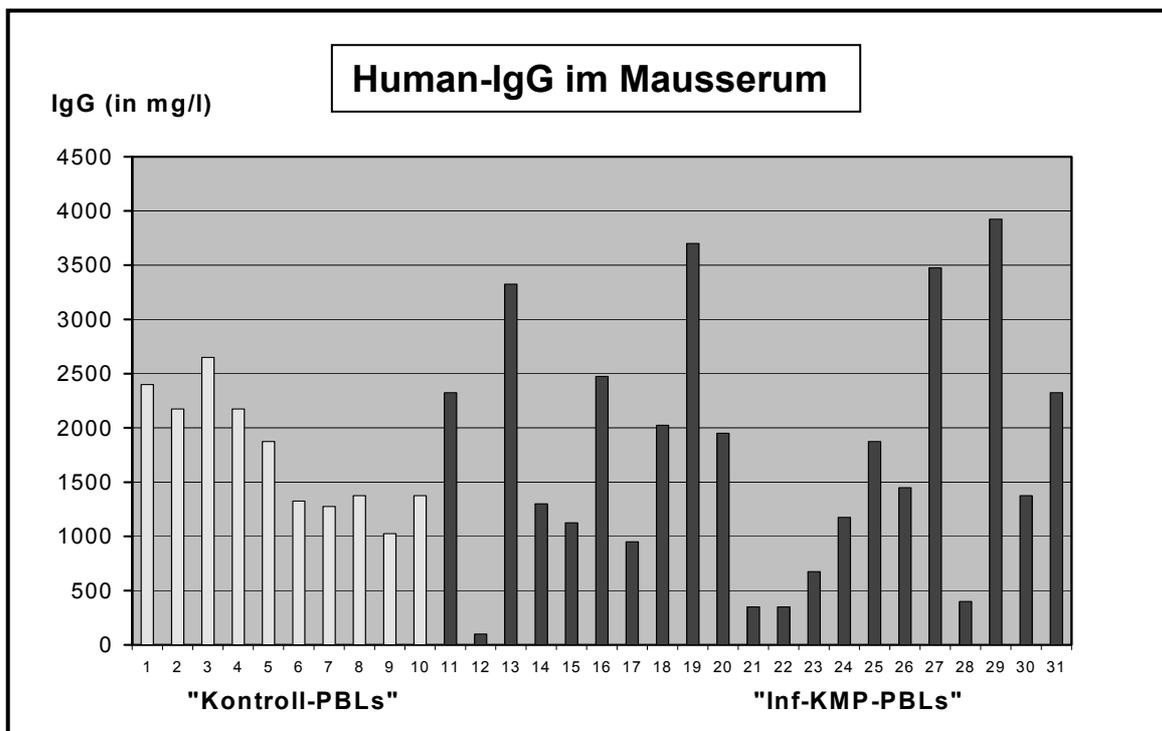
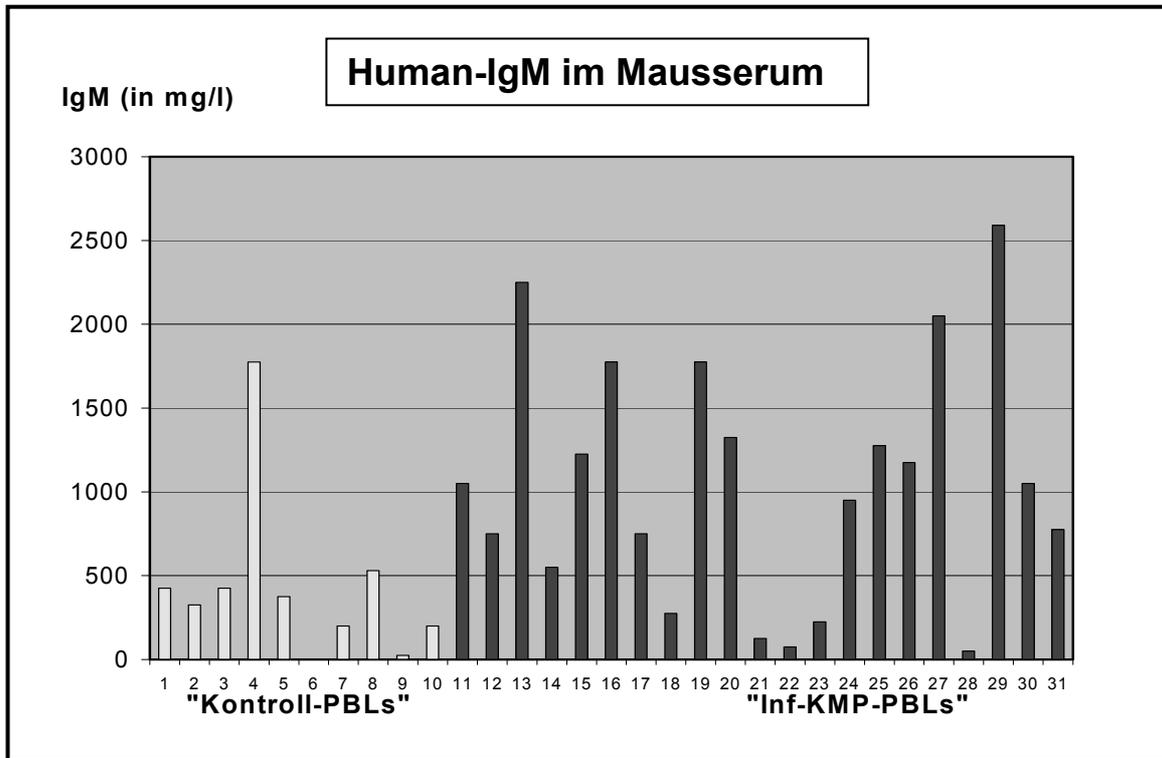
Mittelwerte und Standardabweichungen finden sich in den nachfolgenden Tabellen 9 und 10.

### III.3.1 Humanes IgM und IgG im Serum der SCID-Maus

60 Tage nach Transfer ließen sich in allen Mäusen, die mit  $50 \times 10^6$  PBL`s rekonstituiert wurden, sowohl humanes IgG als auch IgM nachweisen, jeweils bis zu 3925 mg/l bzw. 2590 mg/l. Wie aus Tabelle 8 ersichtlich, war die Höhe des humanen IgG bzw. IgM-Spiegels abhängig vom Spender, und selbst bei den Mäusen, die eine identische Zellzahl vom gleichen Spender erhalten hatten, gab es eine beträchtliche Variabilität der Werte. Zwischen den Mäusen, die PBL`s von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie bzw. Kontrollen erhalten hatten, gab es bei den IgG-Spiegeln keine signifikanten Unterschiede (1745 mg/l vs. 1765 mg/l), wohl aber bei den IgM-Spiegeln (1051 mg/l vs. 428 mg/l;  $p < 0,05$ ). Eine zusammenfassende Übersicht gibt Tabelle 9, eine graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 8.

**Tabelle 9:** Durchschnittswerte des humanen Gesamt-IgG und -IgM im Serum der SCID-hu-PBL-Mäuse 60 Tage nach Transfer.

	Transfer von $50 \times 10^6$ PBL`s <b>gesunder</b> Spender	Transfer von $50 \times 10^6$ PBL`s <b>erkrankter</b> Spender
<b>Anzahl Transfer</b>	<b>11</b>	<b>23</b>
<b>IgG-Bestimmung</b>		
<i>Anzahl gemessener Seren</i>	10	21
<i>Prozentsatz positiver Seren für Human-IgG</i>	100% (10/10)	100% (21/21)
<i>Durchschnittswert für hu-IgG in den positiven Seren</i>	1765 mg/l	1745 mg/l
<i>in % vom Durchschnitt für humane Seren</i>	16,3%	17,0%
<b>IgM-Bestimmung</b>		
<i>Anzahl gemessener Seren</i>	10	21
<i>Prozentsatz positiver Seren für Human-IgM</i>	90% (9/10)	100% (21/21)
<i>Durchschnittswert für hu-IgM in den positiven Seren</i>	428 mg/l	1051mg/l
<i>in % vom Durchschnitt für humane Seren</i>	23,0%	51,1%



**Abbildung 8:** IgM- und IgG-Einzelwerte im Serum der SCID-hu-PBL-Maus 60 Tage nach Transfer. Dargestellt sind die Werte der Mäuse, in die PBL's von gesunden Spendern ("Kontroll-PBLs") bzw. von erkrankten Spendern ("Inf-KMP-PBLs") übertragen wurden.

### *III.3.2 Humane Interleukine 6 und 8 und humaner, solubler Interleukin-2-Rezeptor im Serum der SCID-Maus*

Durch die quantitative Bestimmung der humanen Interleukine 6 und 8 und des solublen IL-2-Rezeptors im Serum der SCID-Maus 60 Tage nach Transfer wurde der Grad der Aktivierung von humanen T- und B-Lymphozyten in der SCID-Maus untersucht.

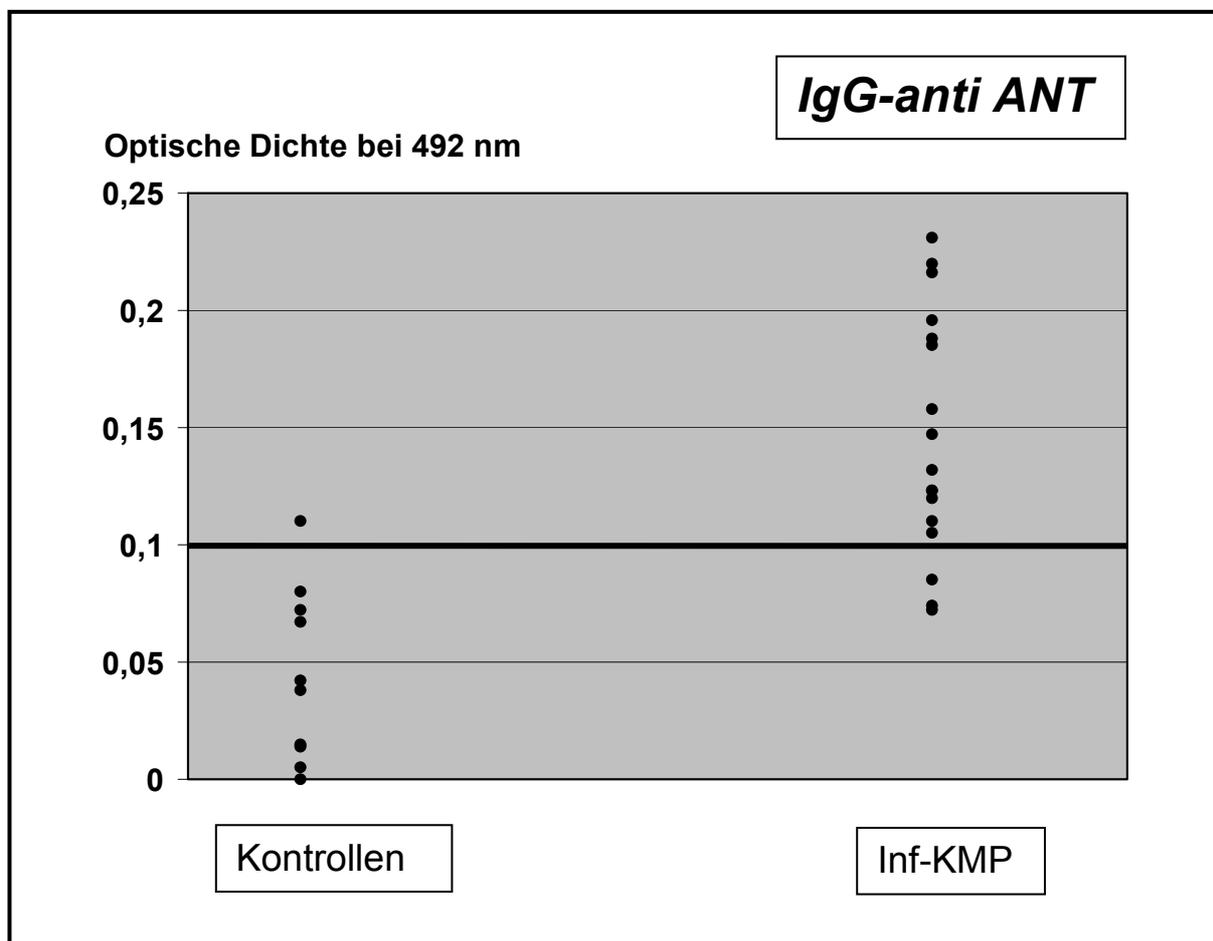
Nach dem Transfer von  $50 \times 10^6$  kompletten PBL's ließ sich Interleukin-6 in 75%, Interleukin-8 in 100% und der s-IL-2-R in 78% der gemessenen Seren der Mäuse nachweisen, die PBL'S von gesunden Spendern erhalten hatten; bei den Tieren, die PBL'S von erkrankten Spendern erhalten hatten, ließ sich IL-6 in 84,2%, IL-8 in 93,8% und der s-IL-2-R in 100% der gemessenen Seren nachweisen. Der Mittelwert nach Transfer von Kontroll-PBLs lag für IL-6 bei 4,27 pg/ml mit einer Spannweite von 3,0-6,5 pg/ml, für IL-8 bei 65 pg/ml mit einer Spannweite von 53-85 pg/ml und für den s-IL-2-R bei 27,3 pmol/l mit einer Spannweite der Beobachtungen von 14-46 pmol/l. Nach Transfer von Inf-KMP-PBLs lag der Mittelwert für IL-6 bei 8,4 pg/ml mit einer Spannweite von 3,0-27,0 pg/ml, für IL-8 bei 91 pg/ml mit einer Spannweite von 42-140 pg/ml und für den s-IL-2-R bei 112 pmol/l mit einer Spannweite der Beobachtungen von 37-245 pmol/l. Sowohl für IL-6 und IL-8 ( $p < 0,05$ ) als auch für den s-IL-2-Rezeptor (0,01) waren somit die Unterschiede zwischen „gesunden“ und „erkrankten“ Seren signifikant. Eine zusammenfassende Übersicht gibt Tabelle 10, eine graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 9.

**Tabelle 10:** Durchschnittswerte der humanen Interleukine 6 und 8 und des solublen Interleukin-2-Rezeptors im Serum der Scid-hu-PBL-Mäuse 60 Tage nach Transfer.

	Transfer von $50 \times 10^6$ <b>Kontroll-PBLs</b>	Transfer von $50 \times 10^6$ <b>Inf-KMP-PBLs</b>
<b>Anzahl Transfer</b>	11	23
<b>IL-6-Bestimmung</b>		
<i>Anzahl gemessener Seren</i>	8	19
<i>Prozentsatz positiver Seren für Human-IL-6</i>	75% (6/8)	84,2% (16/19)
<i>Durchschnittswert für hu-IL-6 in den positiven Seren</i>	4,27 pg/ml	8,38 pg/ml
<i>in % vom Durchschnitt für humane Seren</i>	54%	37,8%
<b>IL-8-Bestimmung</b>		
<i>Anzahl gemessener Seren</i>	6	16
<i>Prozentsatz positiver Seren für Human-IL-8</i>	100% (6/6)	93,8% (15/16)
<i>Durchschnittswert für hu-IL-8 in den positiven Seren</i>	65,2 pg/ml	90,9 pg/ml
<i>in % vom Durchschnitt für humane Seren</i>	248,9%	101,7%
<b>s-IL-2-R-Bestimmung</b>		
<i>Anzahl gemessener Seren</i>	9	20
<i>Prozentsatz positiver Seren für Human-s-IL-2-R</i>	77,8% (7/9)	100% (20/20)
<i>Durschnittswert für hu-s-IL-2-R in den positiven Seren</i>	27,3 pmol/l	112,4 pmol/l
<i>in % vom Durchschnitt für humane Seren</i>	26,4%	95,3%



reproduzieren lässt. Als positiv wurden solche Seren definiert, die eine Differenz der optischen Dichten von mehr als 0,1 bei einer Verdünnung von 1:10 zeigten (siehe II.2.7.5). Mit einer Ausnahme (Maus „Kontroll-PBLs 2“ mit 0,110) enthielten alle Seren von Mäusen, die mit PBL`s von gesunden Spendern rekonstituiert worden waren, keine humanen Autoantikörper gegen den ANT; der Wert im ELISA war für alle Seren zumeist deutlich kleiner als 0,1 (siehe Tabelle 8 bzw. Abb. 10).



**Abbildung 10:** Humane Autoantikörper der Klasse IgG im Serum der SCID-hu-PBL-Maus gegen den ANT 60 Tage nach Transfer. Links sind die Werte der Mäuse dargestellt, die PBL`s von gesunden Spendern erhalten haben, rechts diejenigen, die PBL`s von Patienten mit Inf-KMP erhalten haben.

Die Seren derjenigen Mäuse, die mit PBL`s von Spendern mit inflammatorischer Kardiomyopathie rekonstituiert worden waren, enthielten im Gegensatz dazu humane Autoantikörper gegen den ANT. In diesen Seren war die Bindung an den ANT signifikant höher als die Bindung von Seren aus Tieren, denen PBL`s von gesunden Spendern injiziert worden waren (siehe Abb. 10).

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die von den erkrankten Spendern bekannte Bildung von ANT-spezifischen Autoantikörpern in der SCID-Maus reproduzieren läßt. Die Autoantikörper gegen den ANT waren alle humanen Ursprungs, da die Seren der Mäuse vor dem Transfer der humanen Zellen keinerlei Bindung an den ANT zeigten.

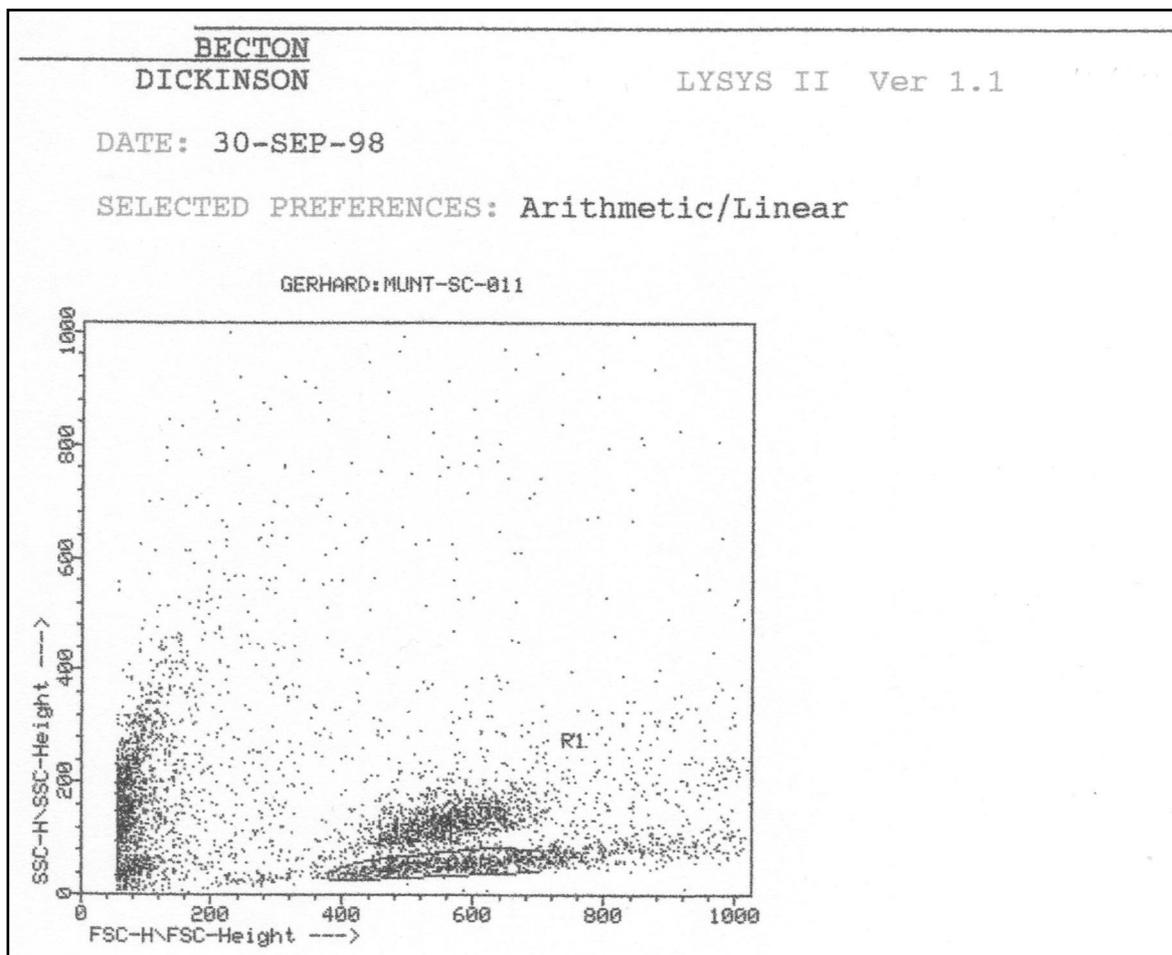
### **III.4 Humane Lymphozyten im peripheren Blut der SCID-Maus**

Durch die Untersuchung des peripheren Blutes der SCID-Maus bezüglich des Vorkommens von humanen PBL`s wurde der Frage nachgegangen, ob es zu einer Ausschwemmung der intraperitoneal injizierten humanen PBL`s gekommen war. Die Beantwortung dieser Frage erscheint sehr wichtig, denn die übertragenen Zellen können nur über das periphere Blut in andere Organe, z.B. den Herzmuskel, der SCID-Maus gelangt sein. Die einzelnen Werte der verschiedenen Subpopulationen für die Tiere, in deren Peripherie humane Lymphozyten nachgewiesen werden konnten, sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Nachweisgrenze der Durchflußzytometrie lag bei 0,5%, geringere Werte ließen sich nicht sicher von Artefakten unterscheiden. Nach dem Transfer von  $50 \times 10^6$  kompletten PBL`s ( $n=34$ ) ließen sich im peripheren Blut von 27 SCID-Mäusen (79,5%) humane T-Lymphozyten (bis 22,16% der mononukleären Zellen) und im Blut von 19 SCID-Mäusen (59%) humane B-Lymphozyten (bis 4,2% der mononukleären Zellen) nachweisen. Unberücksichtigt bleibt dabei die Tatsache, daß bei 4 Tieren keine Messung erfolgte; werden diese herausgerechnet, d.h. berücksichtigt man nur die Anzahl der Tiere, deren Proben gemessen wurden, läßt sich die Prävalenz an Tieren, in deren peripherem Blut humane T-Lymphozyten demonstrierbar waren, auf 90% steigern. Humane B-Lymphozyten konnten dann in 63,5% (19 von 30 gemessenen Proben) nachgewiesen werden. Bei den humanen T-Lymphozyten waren  $CD8^+$ -Zellen häufiger als  $CD4^+$ -Zellen vertreten. In Bezug auf die Prävalenz bzw. die Verteilung

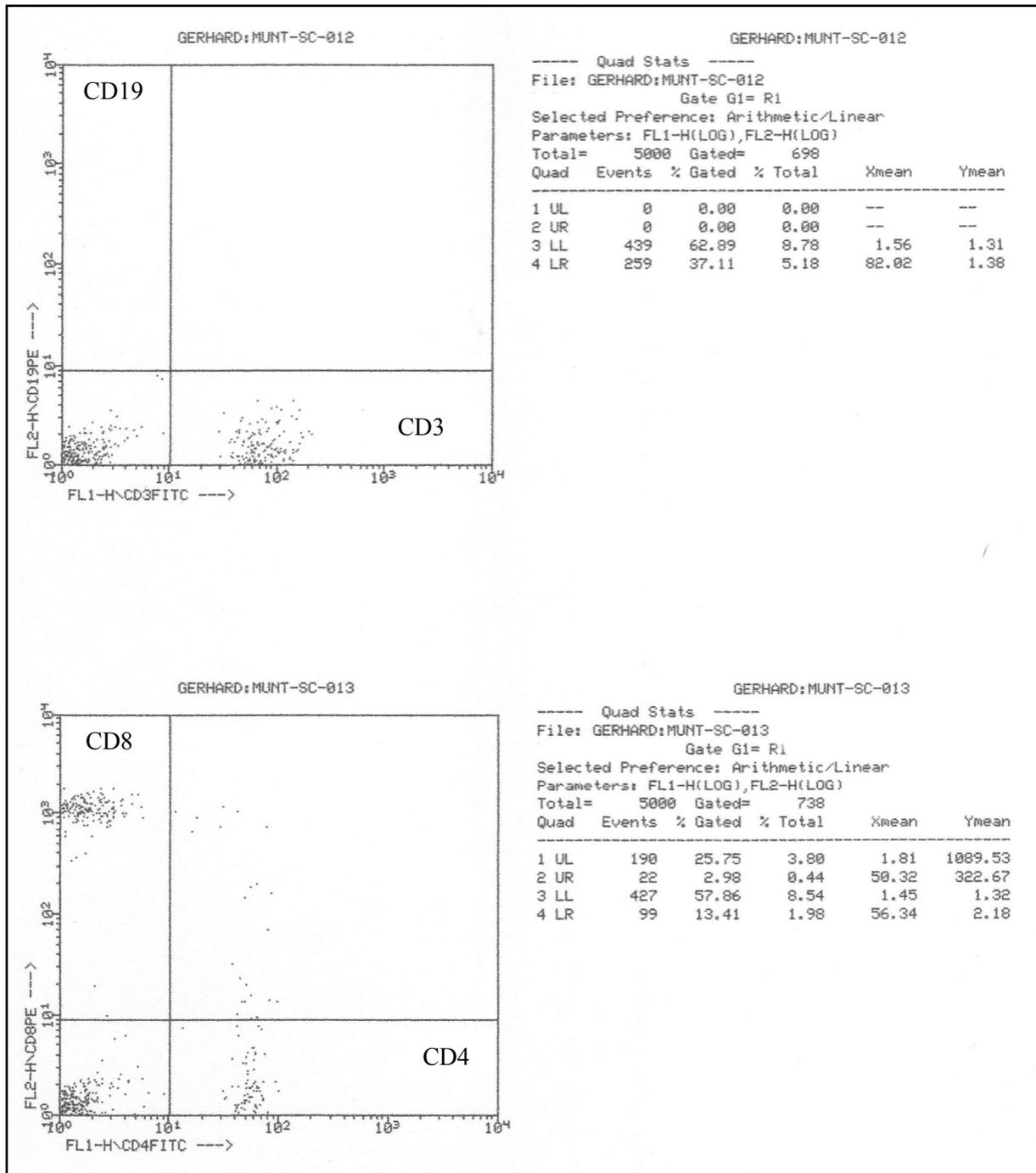
der einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen zeigten sich in Bezug auf die Quelle der Lymphozyten (gesunde Spender versus erkrankte Spender) keine Unterschiede. In der Abbildung 11 ist eine typische FACS-Auswertung dargestellt, die Daten stammen aus der Maus „Inf-KMP-PBL 11“.

**Tabelle 11:** Humane Lymphozyten im peripheren Blut der SCID-hu-PBL-Maus 60 Tage nach Transfer. Dargestellt sind die Einzelwerte aller Tiere, in die humane Zellen übertragen wurden in Prozent aller positiven Zellen im Lymphozyten-Gate.

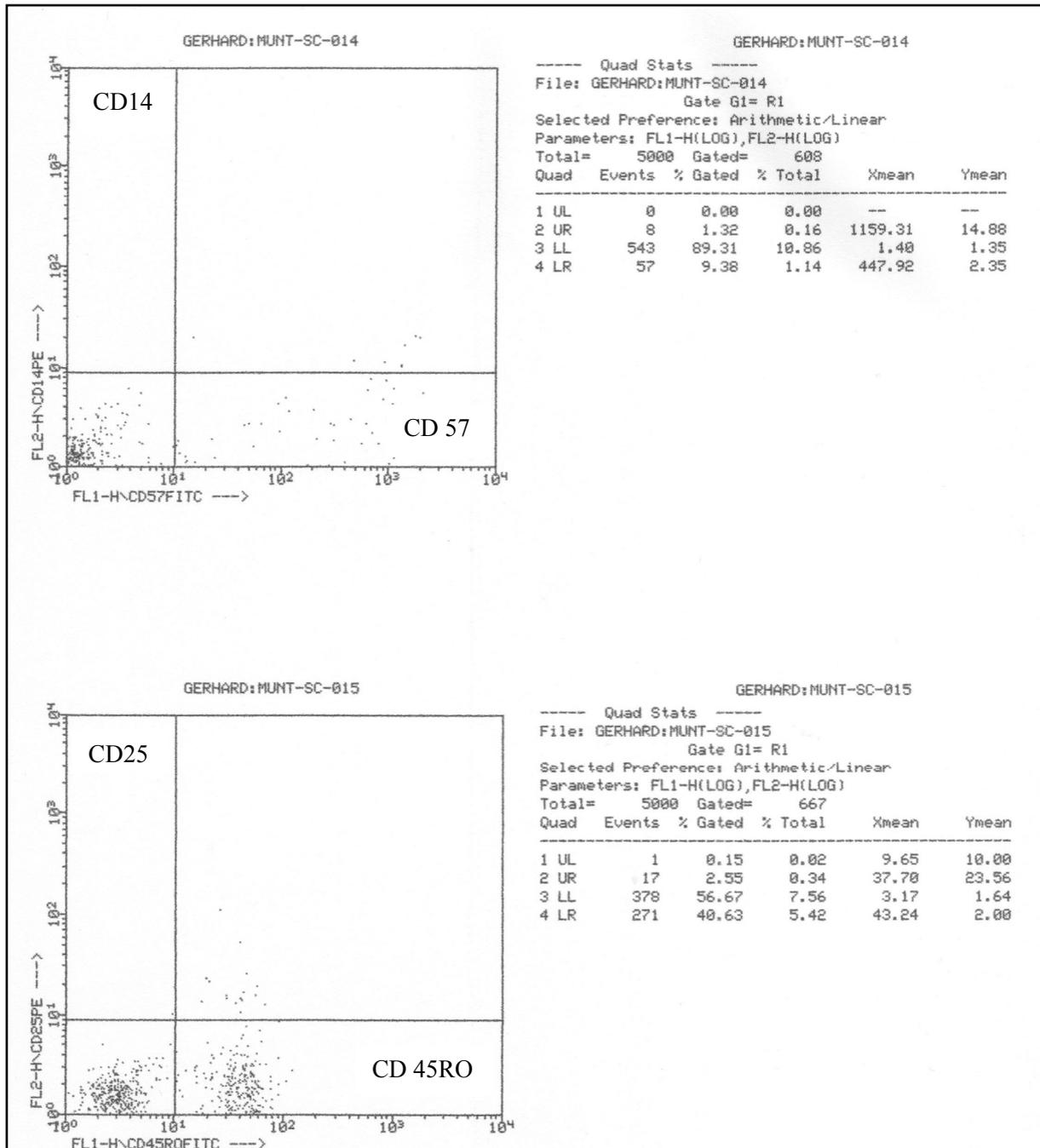
<b>Maus</b>		<b>CD3+</b>	<b>CD19+</b>	<b>CD4+</b>	<b>CD8+</b>	<b>CD45+</b>	<b>CD45+</b>	<b>CD3+</b>
		<b>human</b>	<b>human</b>	<b>human</b>	<b>human</b>	<b>human</b>	<b>Maus</b>	<b>Maus</b>
Kontroll-PBLs	1	8.52	1.00	5.00	4.76	8.66	82.54	n.b.
	2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	4	9.29	1.03	4.65	2.43	9.37	89.65	0.13
	5	7.56	1.52	3.31	6.98	9.64	91.66	0.12
	6	12.67	1.25	5.31	2.70	12.44	84.30	0.26
	7	1.36	0.00	0.88	0.68	1.32	96.76	n.b.
	8	5.92	1.11	4.89	4.97	7.70	84.91	0.64
	9	3.33	0.20	1.41	1.07	3.52	94.32	0.13
	10	0.82	0.12	0.16	0.28	0.90	97.40	n.b.
	11	2.26	0.00	0.70	2.42	2.70	94.08	n.b.
Inf-KMP-PBLs	1	4.05	1.04	0.61	4.12	3.95	93.38	0.01
	2	0.14	1.02	0.01	0.21	1.35	96.47	0.54
	3	3.06	0.82	2.84	0.92	4.12	93.96	n.b.
	4	9.32	1.20	4.08	4.74	10.52	86.00	n.b.
	5	1.25	0.20	0.95	0.24	1.86	95.80	n.b.
	6	22.16	2.00	9.74	9.80	21.60	78.86	n.b.
	7	13.90	0.84	5.56	10.08	17.44	81.76	n.b.
	8	6.10	1.20	6.06	2.32	6.94	86.86	n.b.
	9	3.22	0.80	0.80	2.18	3.06	95.14	0.02
	10	5.86	1.44	2.94	1.74	11.26	86.06	n.b.
	11	5.18	0.00	1.98	3.80	5.42	88.68	n.b.
	12	4.04	0.90	2.00	2.34	5.90	95.40	0.06
	13	0.69	0.15	0.15	0.68	1.14	95.64	0.05
14	0.10	0.01	0.04	0.01	0.14	97.27	0.02	
15	0.78	0.00	0.04	0.71	1.26	93.72	n.b.	
16	4.86	0.68	2.92	2.35	5.24	92.90	n.b.	
17	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
18	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
19	3.68	4.20	0.50	3.72	7.08	87.94	0.88	
20	3.86	1.74	2.18	1.52	n.b.	n.b.	n.b.	
21	0.33	0.55	0.04	0.16	0.74	98.18	0.50	
22	5.90	0.98	0.38	3.34	8.60	96.66	n.b.	
23	8.00	0.86	3.76	7.54	12.66	84.74	n.b.	



**Abbildung 11:** FACS-Protokolle aus der Maus „Inf-KMP-PBLs 11“: Auswertung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut der SCID-hu-PBL-Maus 60 Tage nach Transfer. Dargestellt sind das „Gating“ (Abgrenzung der PBMC von anderen Zellen) und die nachfolgenden Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen bzw. -einzelmarkierungen. Bei den nachfolgend dargestellten Markierungen wurden nur die Zellen analysiert, die sich im PBMC-Gate befanden (Fortsetzung auf den beiden folgenden Seiten).



**Abbildung 11b:** FACS-Protokolle aus der Maus „Inf-KMP-PBLs 11“. Dargestellt sind die Doppelmarkierungen CD3/CD19 und CD4/CD8.



**Abbildung 11c:** FACS-Protokolle aus der Maus „Inf-KMP-PBLs 11“. Dargestellt sind die Einzelmkierungen CD14, CD25, CD45RO und CD57.

### III.5 Humane Lymphozyten und Immunglobuline im Myokard der SCID-Maus

60 Tage nach Transfer der humanen Lymphozyten wurde bei der Untersuchung der murinen Herzen der Frage nachgegangen, ob sich die von den Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie bekannten lymphozytären Infiltrate im Myokard in den SCID-Mäusen reproduzieren läßt und ob es Unterschiede gibt zwischen den Tieren, denen Lymphozyten von gesunden bzw. erkrankten Spendern injiziert worden waren. Es konnten in 27 von 28 untersuchten Herzen humane infiltrierende T-Lymphozyten nachgewiesen werden, sowohl bei Tieren, die PBL`s von erkrankten Spendern erhalten hatten, als auch bei solchen, die PBL`s von gesunden Spendern erhalten hatten. B-Lymphozyten konnten nur im Myokard von Maus „Inf-KMP-PBLs 12“ nachgewiesen werden. Weder nach Transfer von Kontroll-PBLs, noch nach Transfer von Inf-KMP-PBLs gab es bei den Mäusen Unterschiede zwischen der Anzahl von CD2<sup>+</sup>-Zellen und der Anzahl von CD3<sup>+</sup>-Zellen, was auf die Reife aller humanen infiltrierenden T-Lymphozyten schließen läßt. Bei den Mäusen, denen PBL`s von erkrankten Spendern, also Spendern mit inflammatorischer Kardiomyopathie, injiziert worden waren, war die Anzahl der infiltrierenden Lymphozyten allerdings höher und nur in diesen Mäuseherzen konnte als charakteristisches Zeichen einer Herzmuskelentzündung eine fokale Nestbildung beobachtet werden. Die arithmetischen Mittelwerte lagen für die Kontroll-PBLs-Mäuse bei 0,41 Zellen/10 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung und für die Inf-KMP-PBLs-Mäuse bei 2,33 Zellen/10 Gesichtsfelder. Typische histologische Bilder zeigen die Abbildungen 12.1 – 12.5; es handelt sich um Schnitte aus den Herzen der Tiere "Inf-KMP-PBLs 11", "Inf-KMP-PBLs 7" und "Inf-KMP-PBLs 12". Mit 11,8 und 7,7 bzw. 5,7 Zellen/10 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung ließen sich im Herzmuskelgewebe dieser Mäuse deutlich mehr humane infiltrierende Lymphozyten nachweisen als in dem von Mäusen, denen PBL`s von gesunden Spendern injiziert worden waren. Humane Immunglobuline der Klassen G und M ließen sich in allen Herzen nachweisen, sowohl in solchen von „Inf-KMP-PBLs“-Mäusen als auch in denen von „Kontroll-PBLs“-Mäusen. Die Tabellen 12a+b geben einen Überblick über Einzel- bzw. Durchschnittswerte der lymphozytären Infiltrate.

***Herkunft der Abbildungen 12.1-12.5 und 13.1-13.6 :***

Abbildung 12.1a : Maus „Inf-KMP-PBLs 11" / Myokard / 400-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 12.1b : Maus „Inf-KMP-PBLs 11" / Myokard / 800-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 12.2 : Maus „Inf-KMP-PBLs 7" / Myokard / 1000-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 12.3 : Maus „Inf-KMP-PBLs 7" / Myokard / 1000-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 12.4 : Maus „Inf-KMP-PBLs 12" / Myokard / 800-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 12.5 : Maus „Inf-KMP-PBLs 12" / Myokard / 1000-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.1a : Maus „Inf-KMP-PBLs 20" / Milz / 100-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.1b : Maus „Inf-KMP-PBLs 20" / Milz / 400-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.2a : Maus „Inf-KMP-PBLs 11" / Milz / 100-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.2b : Maus „Inf-KMP-PBLs 11" / Milz / 400-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.3a : Maus „Kontroll-PBLs 2" / Milz / 400-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.3b : Maus „Kontroll-PBLs 2" / Milz / 800-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.4a : Maus „Inf-KMP-PBLs 7" / Skelettmuskel / 400-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.4b : Maus „Inf-KMP-PBLs 7" / Skelettmuskel / 800-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.5a : Maus „Inf-KMP-PBLs 7" / Niere / 200-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.5b : Maus „Inf-KMP-PBLs 7" / Niere / 400-fach / CD3<sup>+</sup>

Abbildung 13.6 : Maus „Inf-KMP-PBLs 12" / Leber / 200-fach / CD3<sup>+</sup>

<b>Maus</b>		<b>CD3+</b>	<b>CD3+</b>
		<b>Herz</b>	<b>Muskel</b>
<i>Kontroll-PBLs</i>	1	n.b.	n.b.
	2	0,5	0,3
	3	0,4	0,0
	4	0,3	0,3
	5	0,5	0,2
	6	n.b.	n.b.
	7	0,4	0,2
	8	0,6	0,5
	9	0,2	0,0
	10	n.b.	n.b.
	11	0,4	0,1
<i>Inf-KMP-PBLs</i>	1	1,8	0,4
	2	0,8	0,4
	3	n.b.	n.b.
	4	2,2	0,5
	5	n.b.	n.b.
	6	1,4	0,6
	7	7,7	0,5
	8	0,9	0,2
	9	1,8	0,3
	10	0,7	0,3
	11	11,8	0,8
	12	5,7	0,3
	13	0,0	0,0
	14	1,1	0,2
	15	0,5	0,2
	16	0,4	0,1
	17	0,3	0,0
	18	0,8	0,0
	19	0,8	0,7
	20	1,3	0,2
	21	4,2	0,9
	22	3,2	0,1
	23	n.b.	n.b.

**Tabelle 12a** : Humane infiltrierende Lymphozyten im Herzmuskel und im Skelettmuskel (M. psoas) der SCID-hu-PBL-Maus. Gemessen wurde die Zellzahl / 10 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung.

**n.b.:** Organe standen für eine Untersuchung nicht zur Verfügung.

Abbildung 12.1a

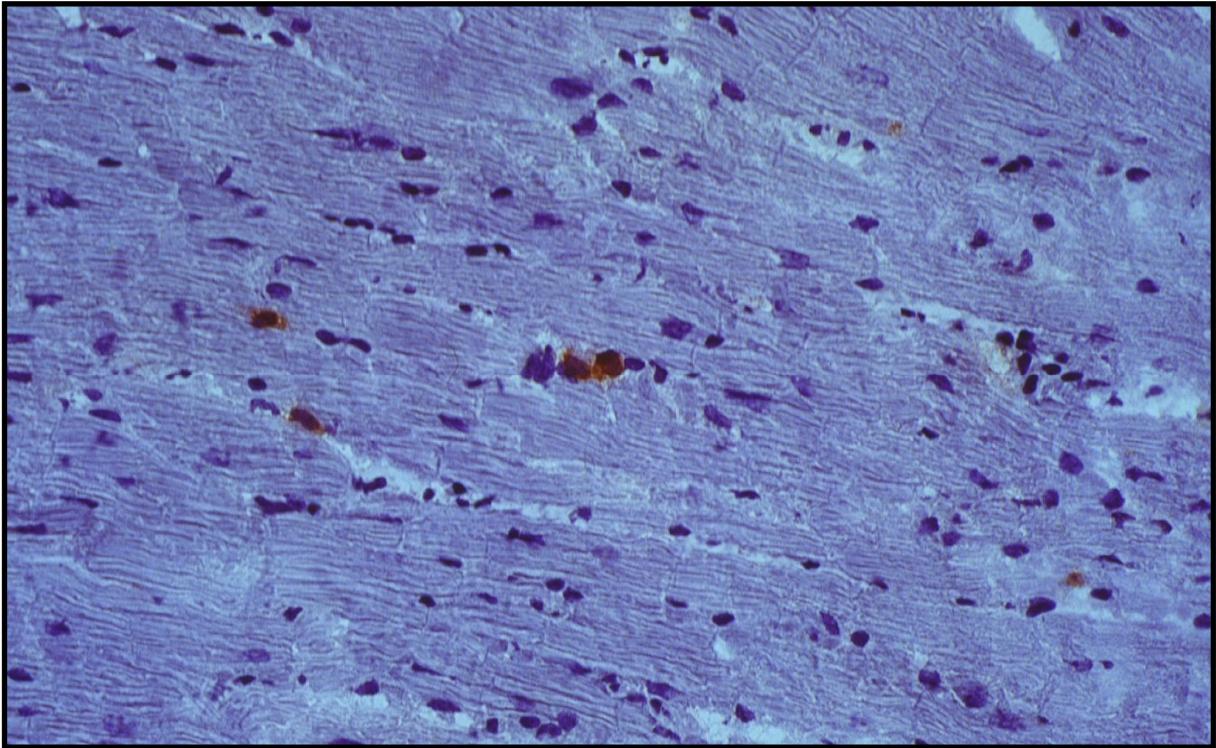


Abbildung 12.1b

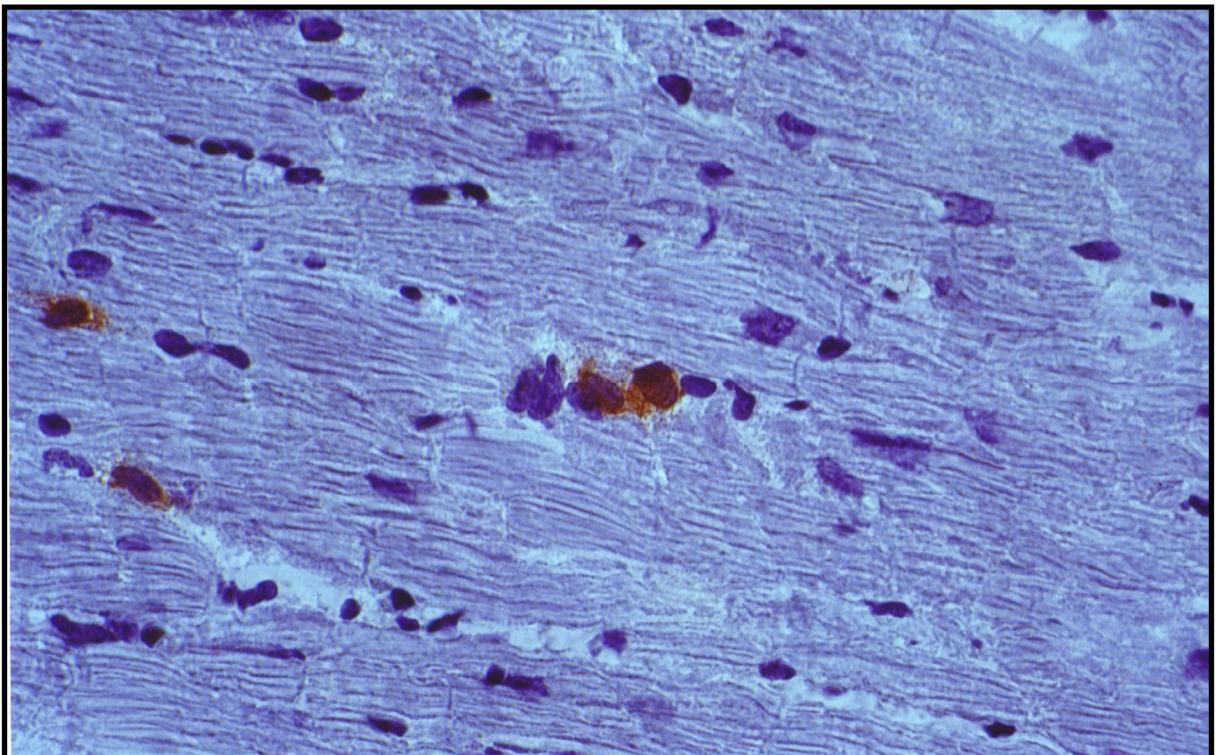


Abbildung 12.2

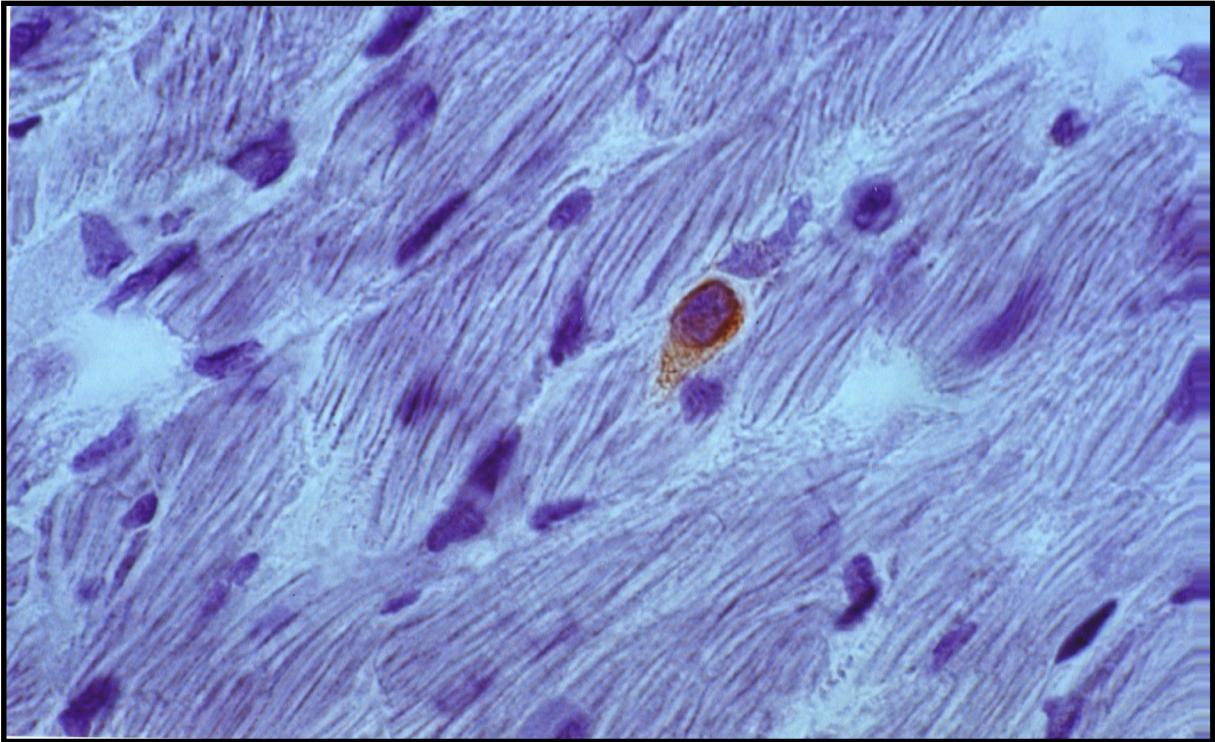


Abbildung 12.3

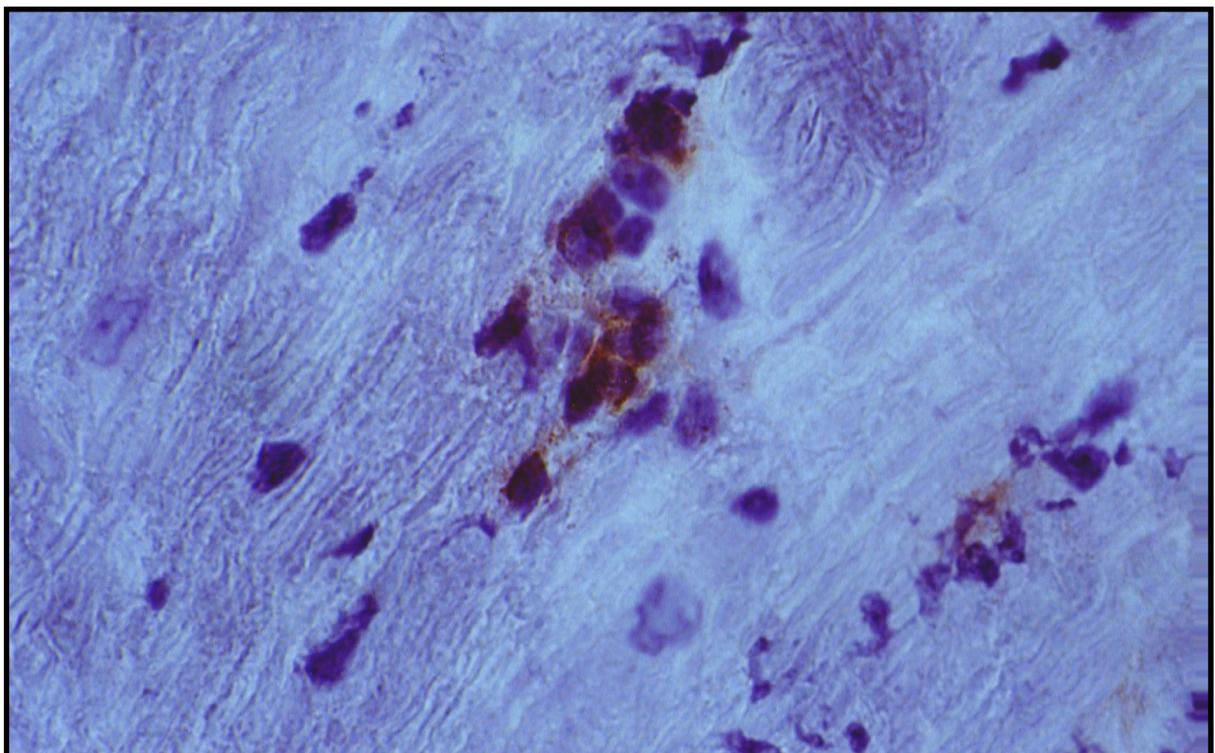


Abbildung 12.4

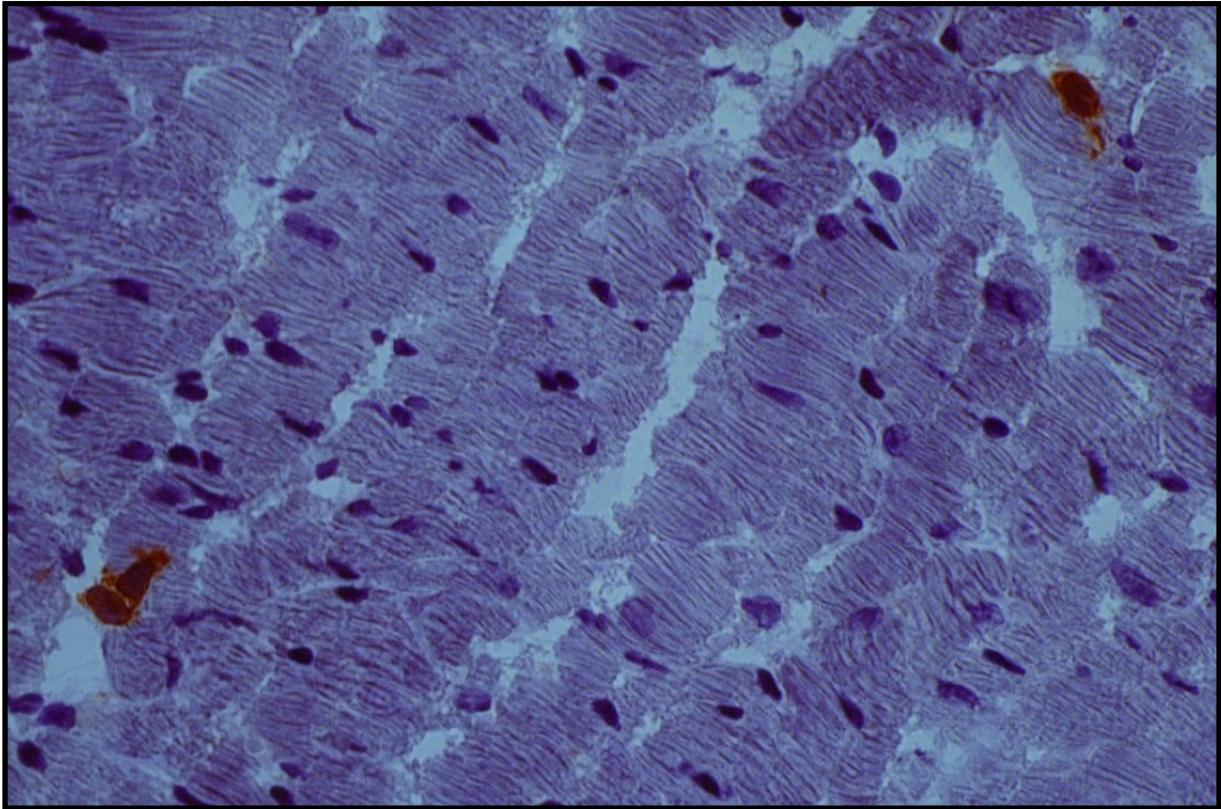
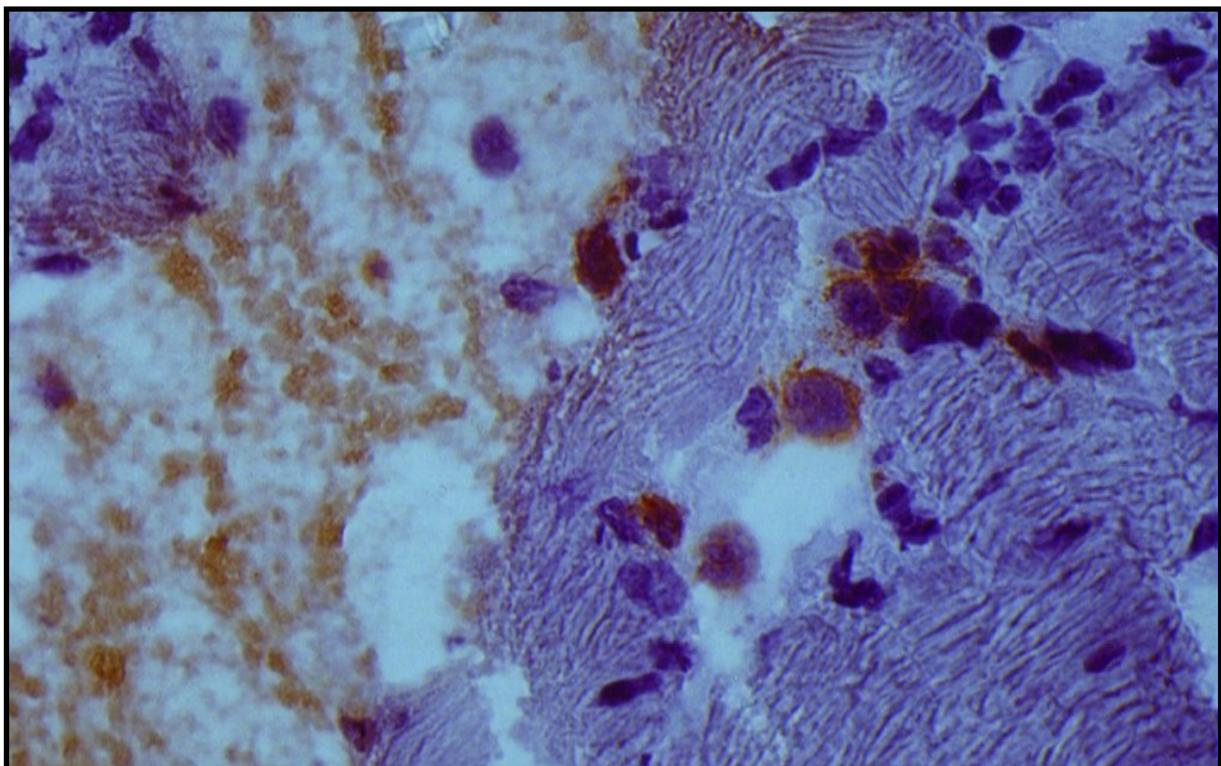


Abbildung 12.5



### **III.6 Humane Lymphozyten und Immunglobuline in Milz, Skelettmuskel, Leber und Niere der SCID-Maus**

Um das Ausmaß der Zellmigration vom Injektionsort Peritonealhöhle in die Milz zu bestimmen, wurden die Milzen der SCID-Mäuse 60 Tage nach Transfer auf ihren Gehalt an humanen T-Lymphozyten und Immunglobulinen hin untersucht. Nach dem Transfer von  $50 \times 10^6$  kompletten PBL's konnten in allen untersuchten Organen (n=28) sowohl humane T-Lymphozyten als auch humane Immunglobuline nachgewiesen werden. Die Menge der humanen Lymphozyten im Milzgewebe war sehr variabel, die Spannweite der Beobachtungen lag bei 4-48% aller Zellen. In Bezug auf die Abhängigkeit von der Herkunft der PBL'S (gesunde Spender versus erkrankte Spender) gab es keine Unterschiede. Zu beobachten war häufig eine perivaskuläre Anordnung der humanen Lymphozyten. Hierbei waren ebenfalls keine erkennbaren Unterschiede bezüglich der Herkunft der Zellen zu beobachten. Entsprechende histologische Bilder zeigen die Abbildungen 13.1-13.3.

Um die Frage beantworten zu können, ob die infiltrierenden humanen T-Lymphozyten und Immunglobuline herzmuskelspezifisch waren, wurden Skelettmuskulatur (M. psoas), je eine Niere pro Tier und die Leber untersucht. Dabei ließen sich in 79% (22/28) aller untersuchten Skelettmuskeln (sowohl von Mäusen, die PBL'S von gesunden Spendern erhalten hatten als auch von Tieren, die PBL'S von erkrankten Spendern erhalten hatten) humane Lymphozyten und in 100% humane Immunglobuline (28/28) nachweisen; die Größenordnung lag bei 0,1 bis 0,9 Zellen/10 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung (Gesamt-Mittelwert bei 0,31 Zellen) und war somit deutlich niedriger als jene im Myokard (0,0-11,8 Zellen/10 Gesichtsfelder; Gesamt-Mittelwert bei 1,92 Zellen). Der arithmetische Mittelwert der humanen infiltrierenden Zellen in der Skelettmuskulatur der „Kontroll-PBLs“-Mäuse betrug 0,20 Zellen/10 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung, der in der Skelettmuskulatur der „Inf-KMP-PBLs“-Mäuse betrug 0,34 Zellen/10 Gesichtsfelder. Bezüglich der Ablagerungen von Immunglobulinen in der Skelettmuskulatur gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit verschiedener Herkunft der injizierten humanen Zellen.

Sowohl in den untersuchten Nieren als auch in den untersuchten Lebern waren

nur sehr inkonstant vereinzelte humane Zellen nachweisbar, diese waren fast ausschließlich in den Glomeruli der Niere und den Sinus der Leber zu finden. Interessanterweise befanden sich unter diesen bei den untersuchten Lebern einige sehr wenige humane CD11b<sup>+</sup>-Zellen, die allerdings zwischen den Leberepithelien zu sehen waren und sonst in keinem der anderen Organe vorkamen; die Größenordnung betrug hier unter 0,01 Zellen/10 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung. Die Nieren und Lebern wurden nicht auf humane Immunglobuline hin untersucht. Entsprechende histologische Bilder zeigen die Abbildungen 13.4-13.6.

Abbildung 13.1a

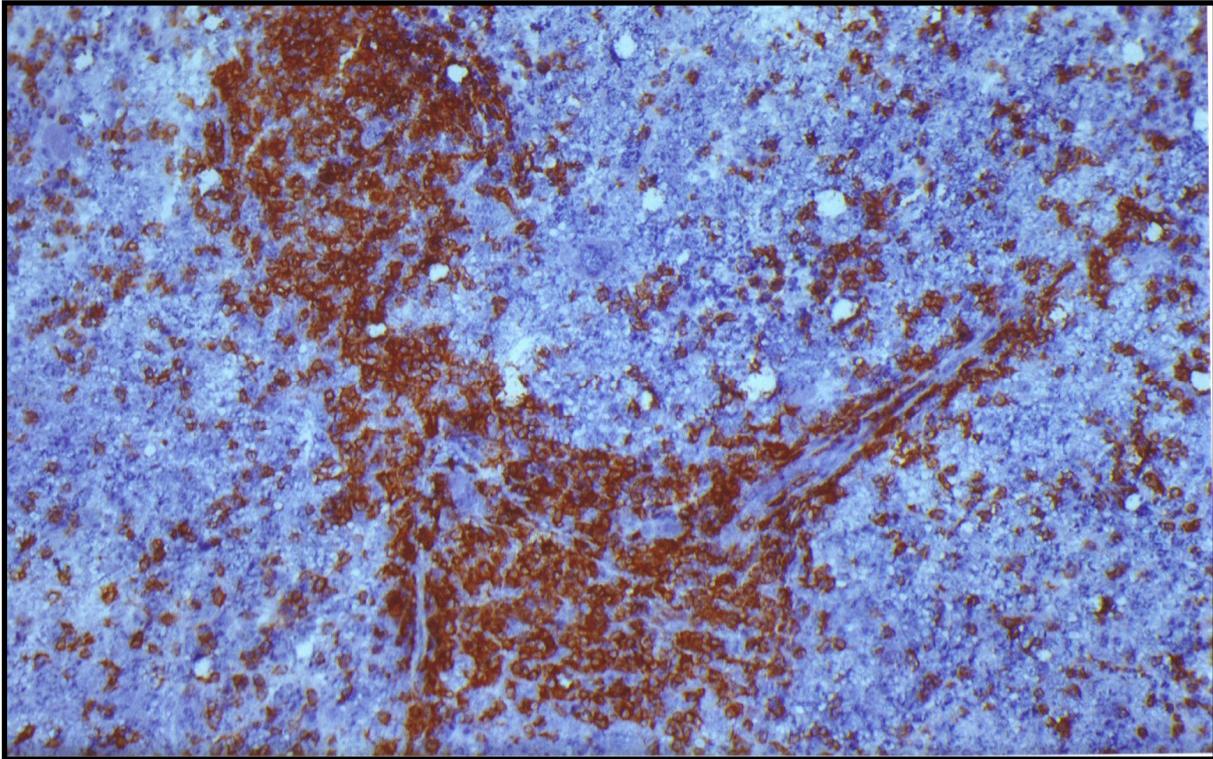


Abbildung 13.1b

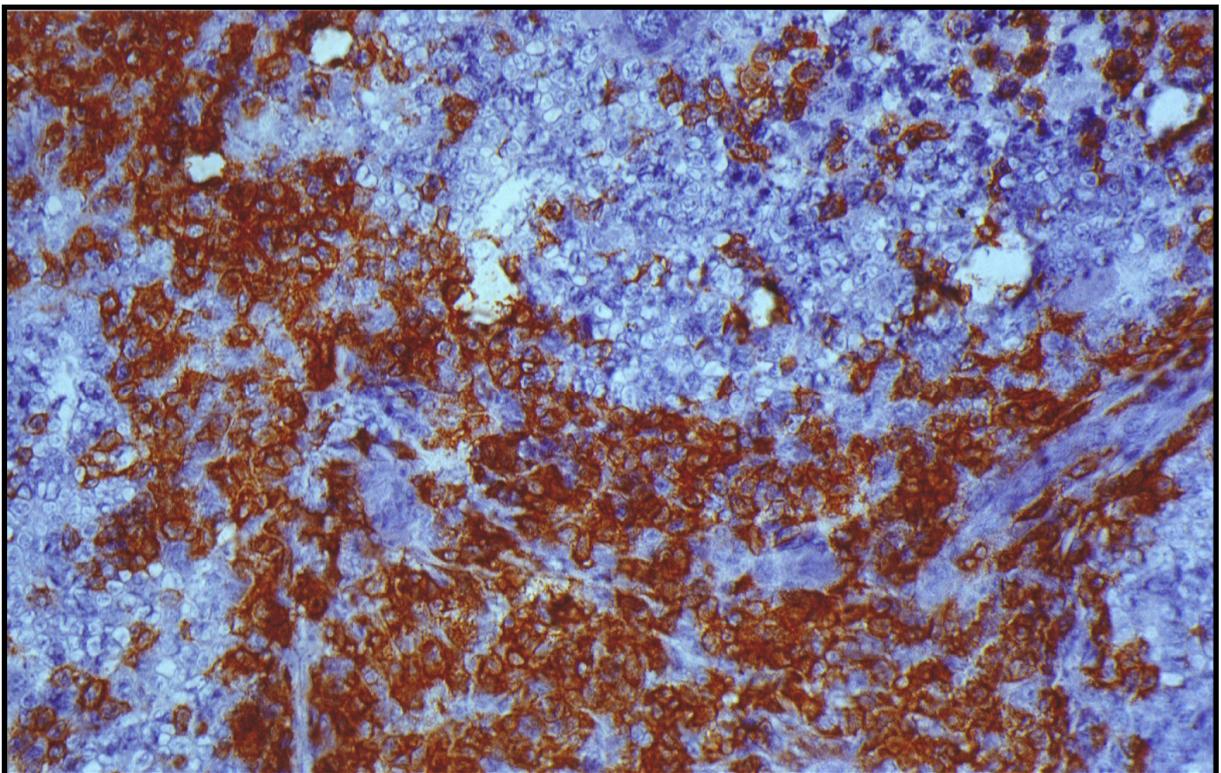


Abbildung 13.2a

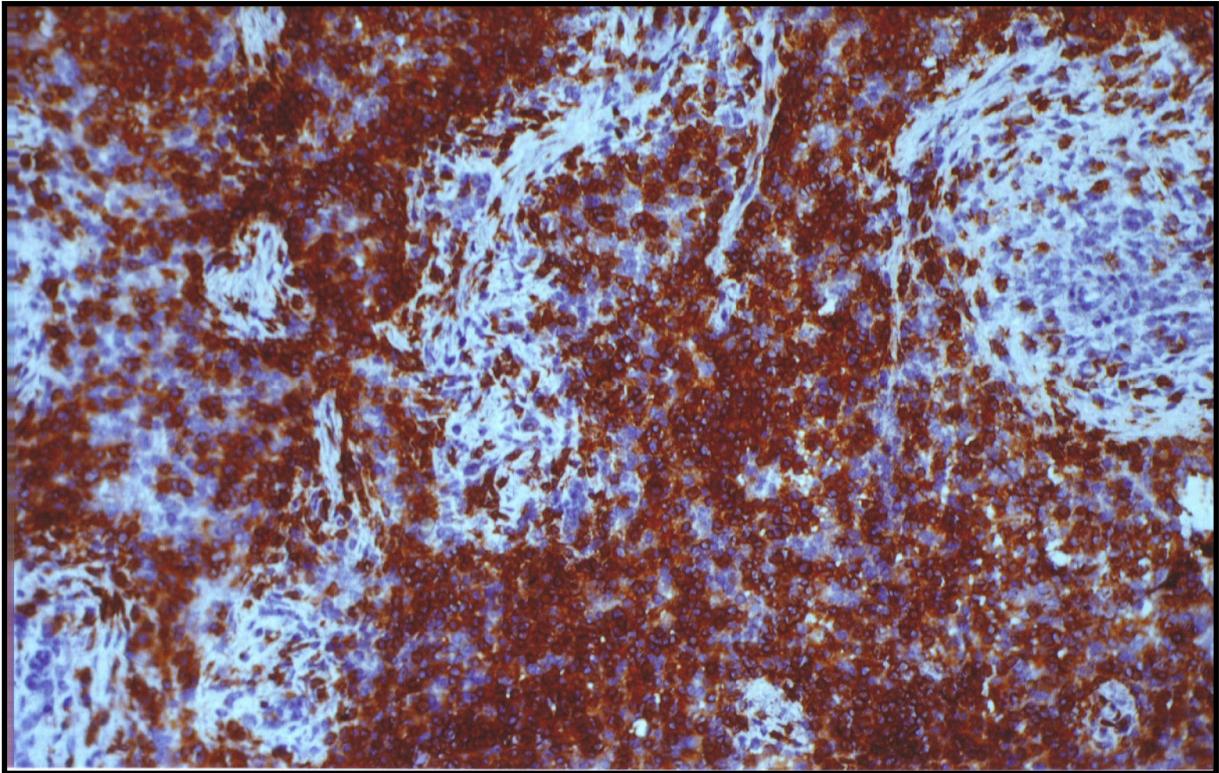


Abbildung 13.2b

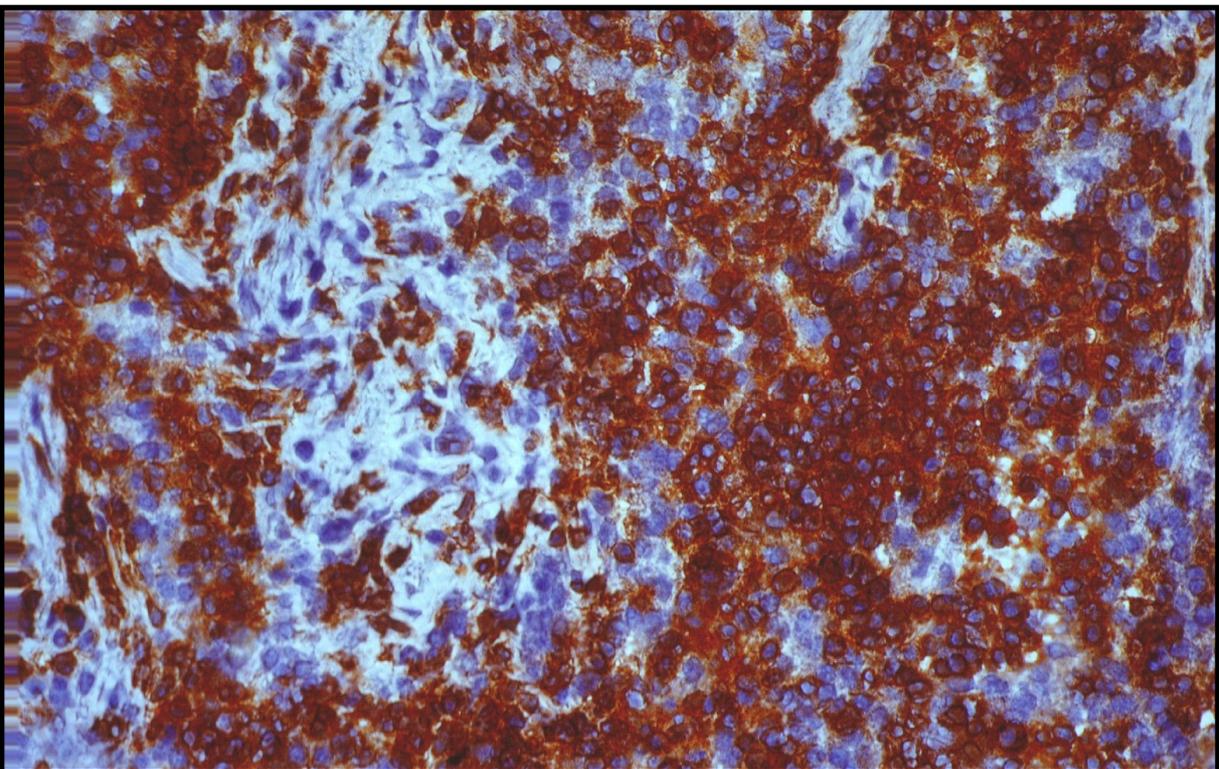


Abbildung 13.3a

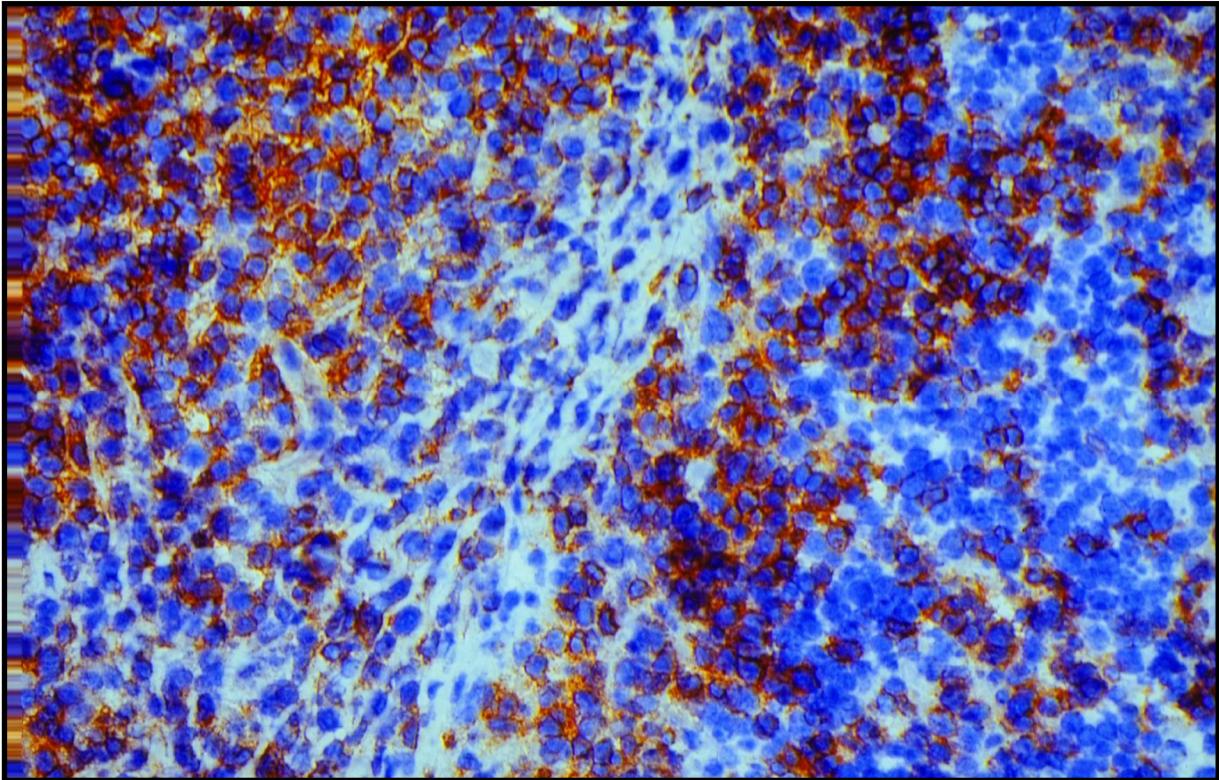


Abbildung 13.3b

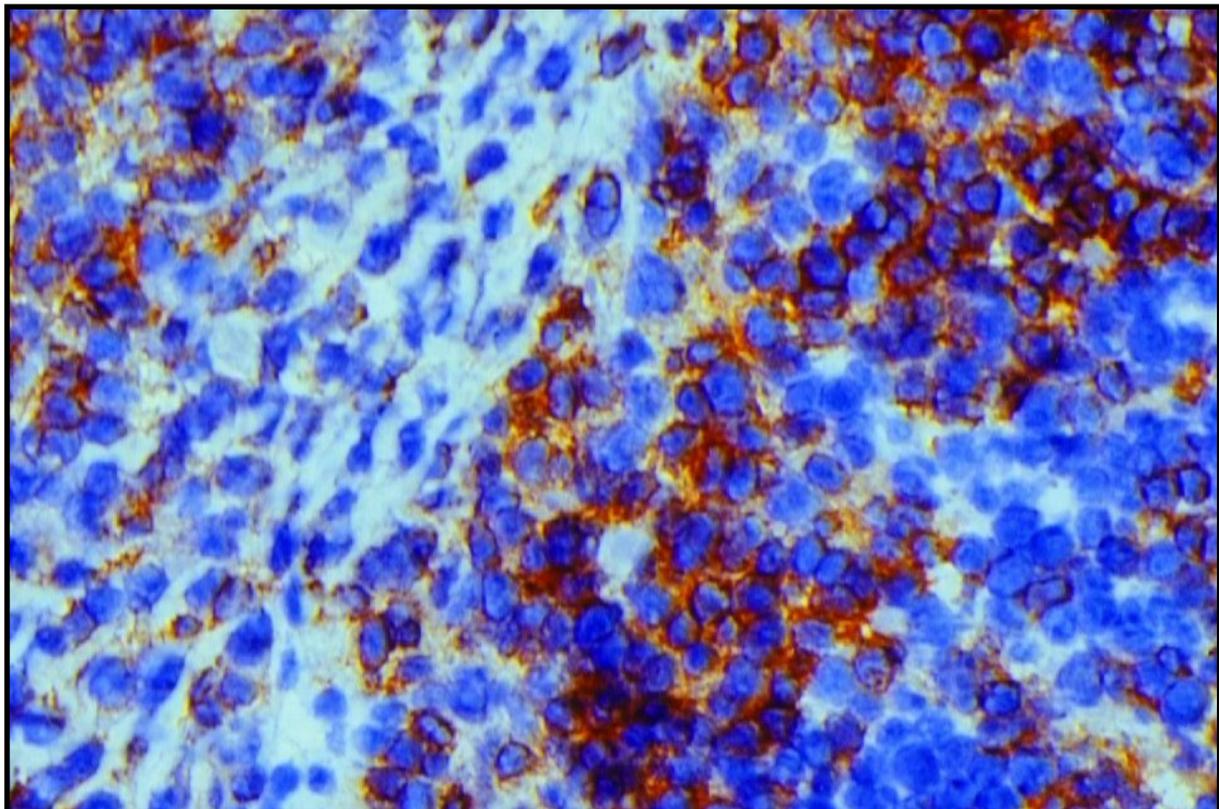


Abbildung 13.4a

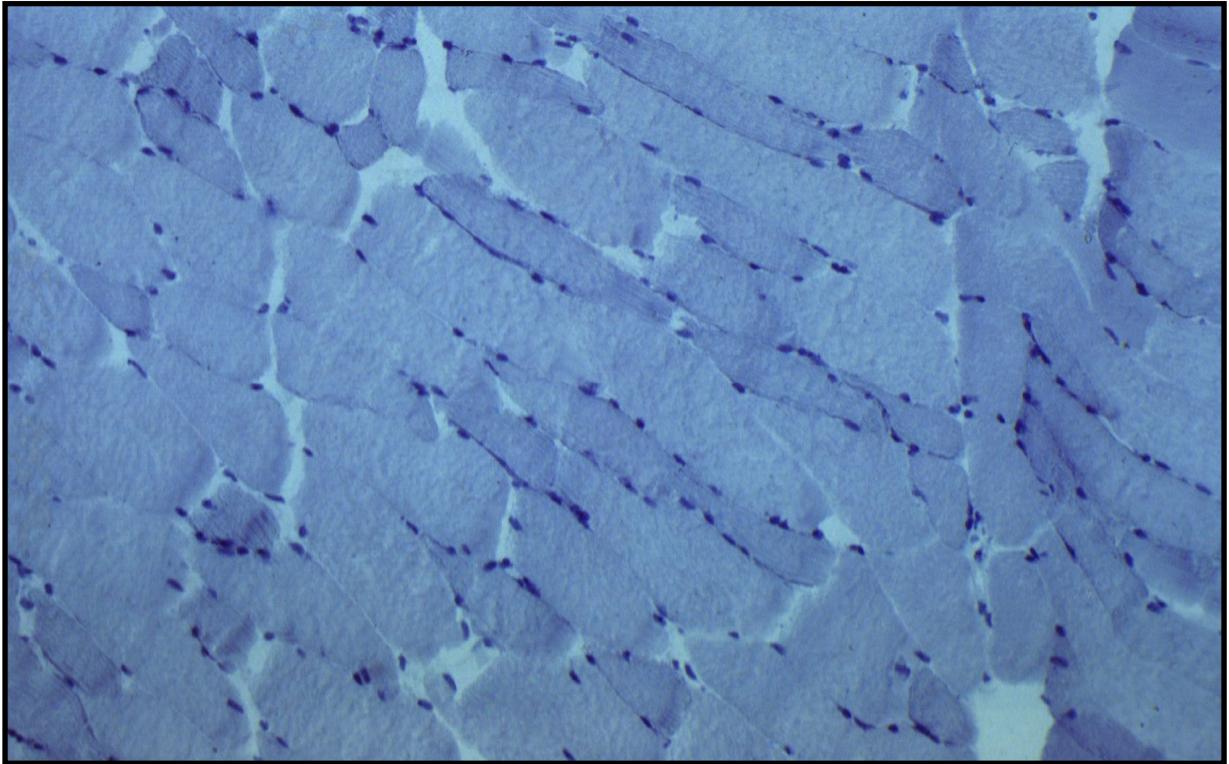
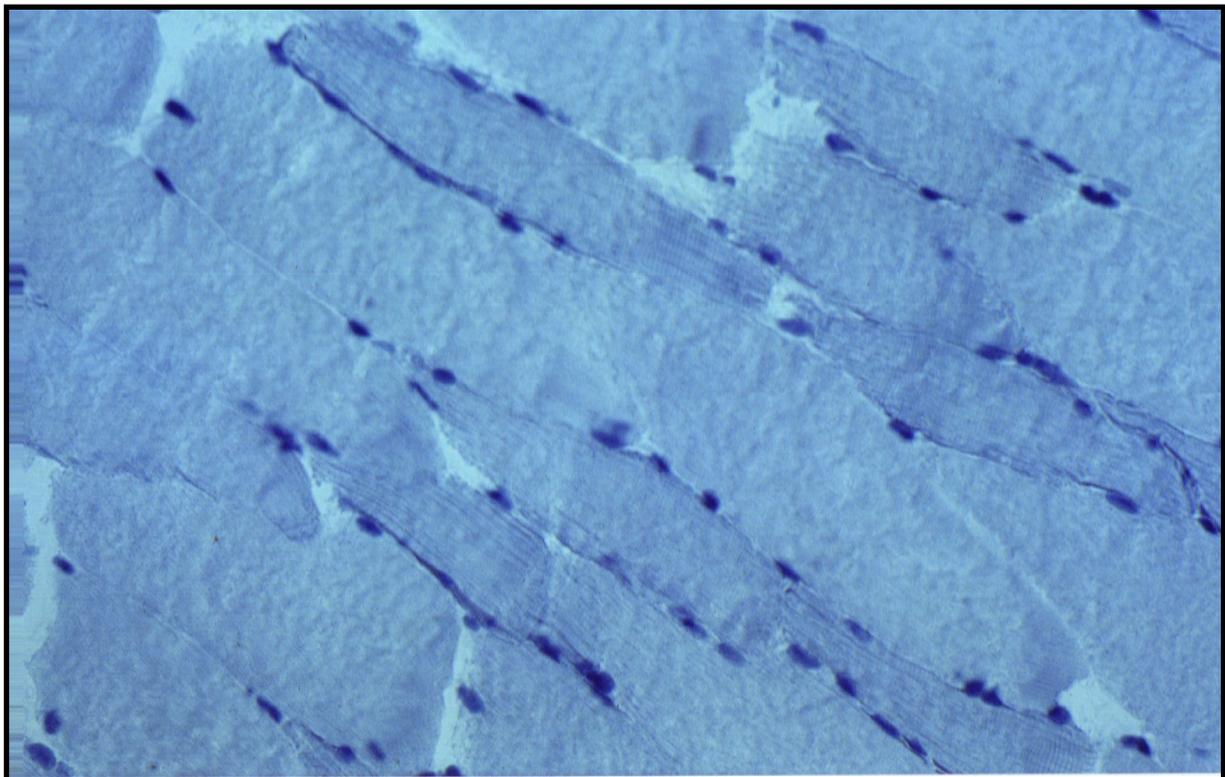
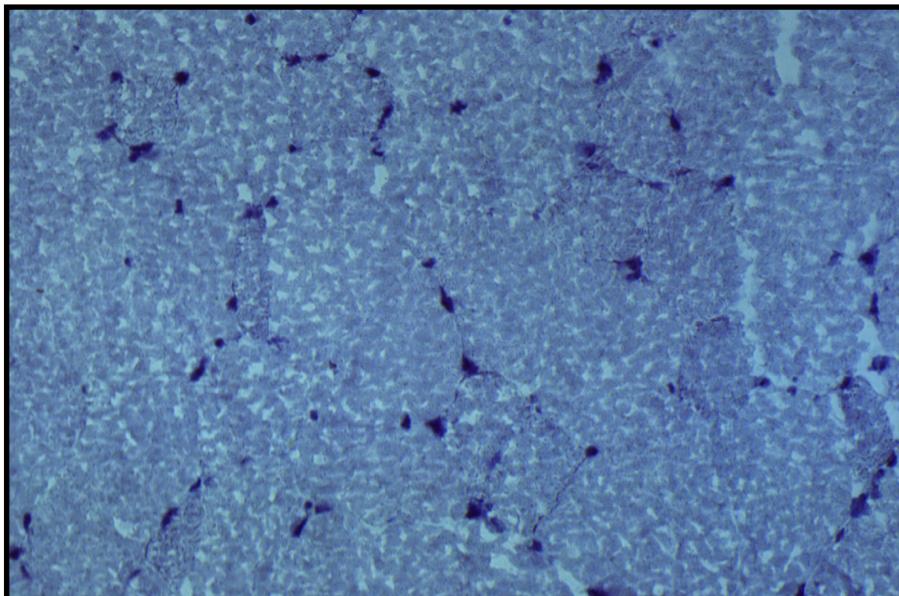
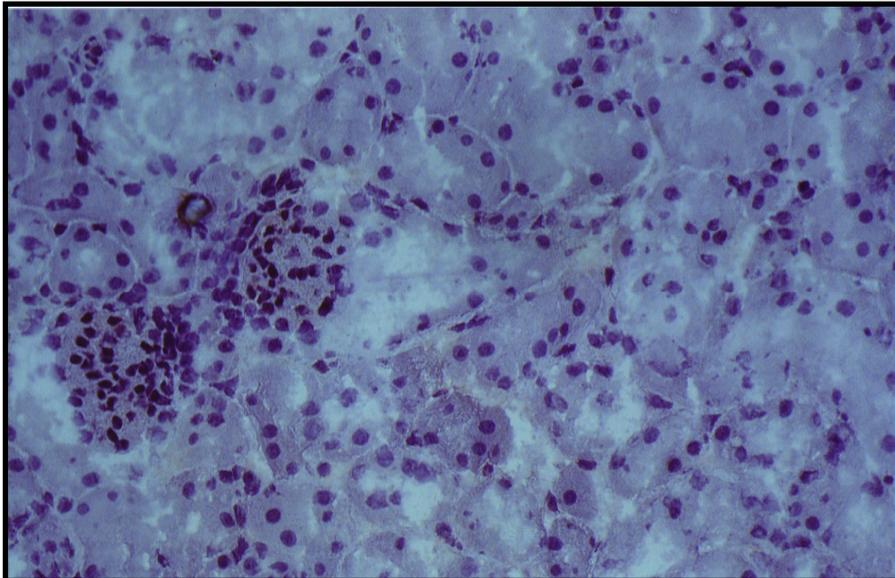
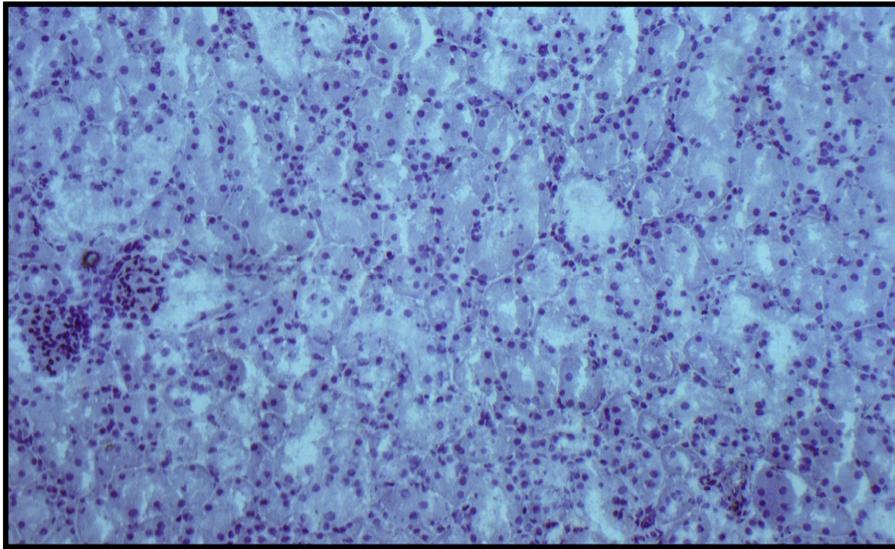


Abbildung 13.4b



Abbildungen 13.5a,b und 13.6



**Tabelle 12b:** Durchschnittswerte der humanen lymphozytären Infiltrate im Myokard und im Skelettmuskel der untersuchten SCID-hu-PBL-Mäuse in Zellen/10 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung.

	<b>CD3<sup>+</sup>/Herzmuskel</b>	<b>CD3<sup>+</sup>/Skelettmuskel</b>
<i>Mäuse mit Kontroll-PBLs:</i>	<b>0,41</b> (0,2-0,6) (n=8)	<b>0,20</b> (0,0-0,5)
<i>Mäuse mit Inf-KMP-PBLs:</i>	<b>2,33</b> (0,0-11,8) (n=20)	<b>0,34</b> (0,0-0,9)
<i>Mäuse Gesamt:</i>	<b>1,92</b> (0,0-11,8) (n=28)	<b>0,31</b> (0,0-0,9)

### III.7 Linksventrikuläre Hämodynamik der Mäuseherzen

60 Tage nach Transfer der humanen Lymphozyten wurde bei der Untersuchung der linksventrikulären Hämodynamik der SCID-Mäuse der Frage nachgegangen, ob sich die von den Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie bekannten linksventrikulären Funktionsstörungen reproduzieren lassen bzw. ob es Unterschiede gibt zwischen den Tieren, denen Lymphozyten von gesunden bzw. erkrankten Spendern injiziert worden waren. Es konnte bei 55 der 56 Tiere (22 unbehandelte Tiere / 11 mit Transfer von Kontroll-PBLs / 23 mit Transfer von Inf-KMP-PBLs) auswertbares Material gewonnen werden. Je Tier wurden nach Punktion des linken Ventrikels unmittelbar fünf direkt aufeinanderfolgende Zyklen im steady state zur Auswertung herangezogen, lediglich bei 5 Mäusen konnten nur vier aufeinanderfolgende Zyklen ausgewertet werden. Herzfrequenzen und Ventrikeldrücke waren in dieser Phase stabil. Neben der Herzfrequenz und den Ventrikeldrücken wurde einer der

wesentlichen Parameter, die die Kontraktilität des Herzens bestimmen, die Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel als erster Ableitung des Drucksignals herangezogen <sup>(121;116)</sup>. Der Durchschnitt der Herzfrequenzen betrug bei den Kontrolltieren, die keine humanen Zellen injiziert bekommen hatten, 243 ( $\pm 20$ ) Schläge/Minute, bei den Mäusen, die mit Zellen von gesunden Spendern rekonstituiert worden waren, 221 ( $\pm 18$ ) Schläge/Minute und bei den Mäusen, die Zellen von erkrankten Spendern transferiert worden waren, 246 ( $\pm 15$ ) Schläge/Minute. Der Durchschnitt der maximalen Ventrikeldrücke betrug bei den unbehandelten Kontrollen 63 ( $\pm 3,4$ ) mmHg, bei den „Kontroll-PBLs“-Mäusen 57 ( $\pm 3,1$ ) mmHg und bei den „Inf-KMP-PBLs“-Tieren 50 ( $\pm 3,6$ ) mmHg. Der Durchschnittswert der Druckanstiegsgeschwindigkeiten betrug bei den unbehandelten Kontrollen 2608 ( $\pm 136$ ) mmHg/Sekunde, bei den „Kontroll-PBLs“-Mäusen 2466 ( $\pm 123$ ) mmHg/Sekunde und bei den „Inf-KMP-PBLs“-Tieren 1695 ( $\pm 109$ ) mmHg/Sekunde. Herzfrequenz und Ventrikeldrücke aller drei Tiergruppen waren somit vergleichbar. Demgegenüber zeigte sich bei den Tieren, die mit PBL`s von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie rekonstituiert worden waren, eine im Durchschnitt deutlich niedrigere linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit als bei den Mäusen, die mit PBL`s von gesunden Spendern rekonstituiert worden waren bzw. als bei den Kontrollen, denen keine humanen PBL`s injiziert worden waren; diese Unterschiede sind signifikant ( $p < 0,01$ ). Sämtliche bei der Messung der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeiten, Frequenzen und maximalen Drücke ermittelten Einzelwerte sind in den Tabellen 14 und 15 aufgeführt, eine übersichtlichere Darstellung dieser Werte geben die Diagramme in den Abbildungen 14a und 14b.

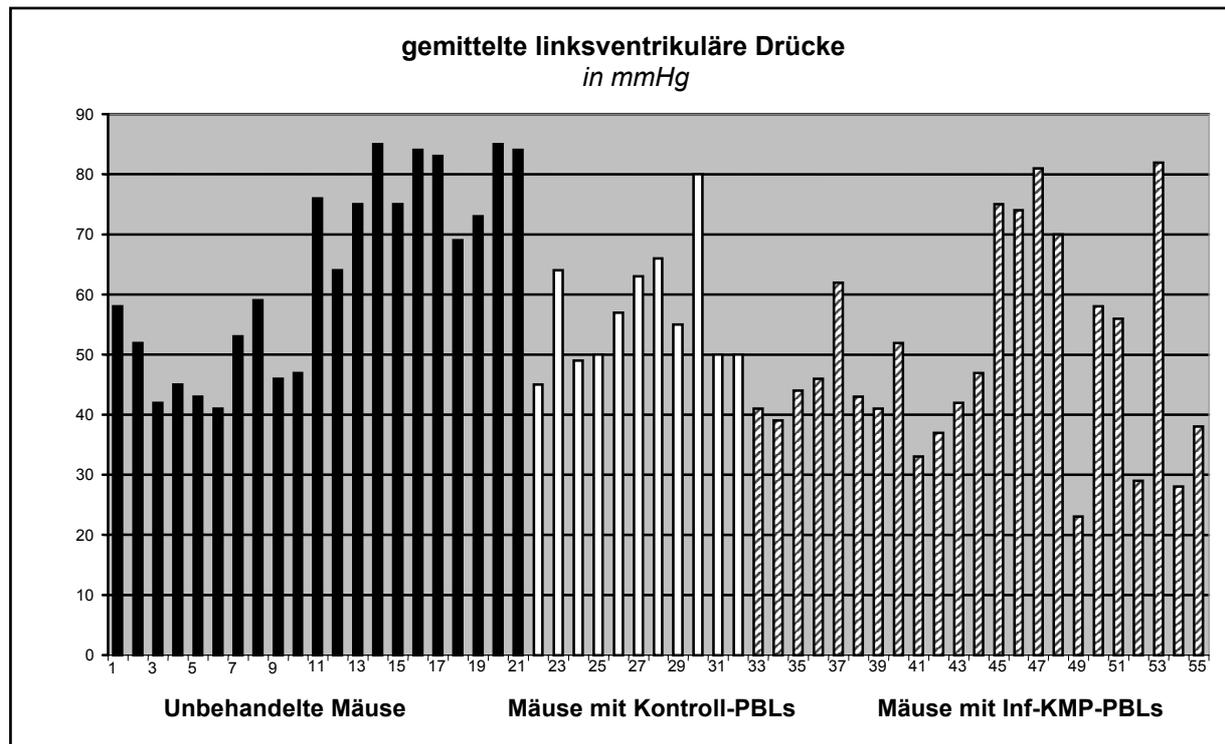
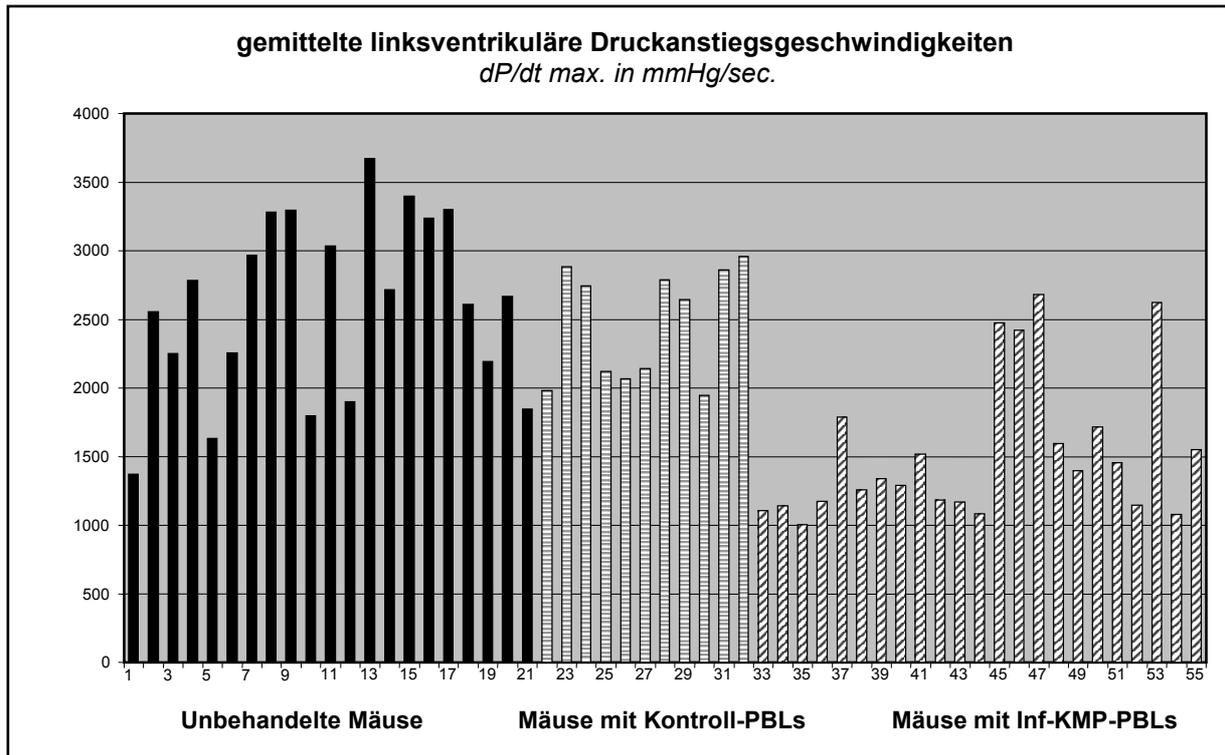
**Tabelle 14:** Werte der einzelnen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeiten der im steady state gemessenen fünf aufeinanderfolgenden Zyklen für jede SCID-Maus nach Punktion des linken Ventrikels (nächste Seite).

Maus	dP/dt 1 in	dP/dt 2 in	dP/dt 3 in	dP/dt 4 in	dP/dt 5 in	dP/dt Mittel
	mmHg/sec.	mmHg/sec.	mmHg/sec.	mmHg/sec.	mmHg/sec.	in mmHg/sec.
unbehandelt 1	1420	1438	1334	1388	1294	1374
2	2716	2562	2516	2534	2438	2554
3	2214	2308	2334	2308	2098	2252
4	3188	2616	2688	2642	-----	2784
5	1542	1642	1662	1672	1656	1634
6	3250	2036	1964	2018	2000	2254
7	3062	3062	2944	2834	2928	2966
8	3100	3100	3364	3556	3292	3282
9	2740	3012	3126	3100	4500	3296
10	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11	1800	1790	1720	1900	1770	1796
12	2850	3264	3028	3208	2812	3032
13	2032	1848	1822	2104	1680	1897
14	3785	4035	3500	3500	3535	3671
15	2700	2722	2516	2663	2984	2717
16	3271	3229	3354	3479	3650	3396
17	3571	3531	2903	3222	2953	3236
18	3328	3156	3328	3297	3391	3300
19	2694	2719	2488	2588	2556	2609
20	2570	2177	2250	2010	1962	2194
21	3103	2512	2462	2539	2729	2669
22	1758	1742	1852	2031	1839	1844
Kontroll-PBLs 1	2062	1890	1986	2066	1890	1979
2	2636	2760	3048	2976	3000	2884
3	2840	2982	2400	2660	2826	2742
4	2100	2112	2167	2111	-----	2122
5	2080	1975	2062	2050	2175	2068
6	2350	2375	2300	2155	1525	2141
7	2946	2876	2867	2680	2564	2787
8	2860	2500	2500	2666	2680	2641
9	2304	1944	1776	1764	-----	1946
10	2834	2882	2984	2842	2750	2858
11	3150	3196	2984	2868	2588	2958
Inf-KMP-PBLs 1	1288	1042	1086	1098	1025	1108
2	1298	1054	1033	1187	1125	1139
3	1073	1001	975	965	1014	1006
4	1175	1187	1150	1189	1169	1174
5	1940	2384	1436	1388	-----	1788
6	1125	1250	1312	1220	1376	1257
7	1530	1400	1390	1170	1190	1336
8	1396	1344	1266	1278	1160	1289
9	1530	1420	1580	1630	1420	1516
10	1208	1183	1208	1147	1175	1184
11	1364	1198	1090	1135	1068	1171
12	1062	1083	900	1203	1156	1081
13	2387	2387	2569	2556	2472	2474
14	2458	2329	2462	2425	-----	2419
15	2792	2797	2538	2625	2653	2681
16	1492	1661	1408	1676	1739	1595
17	1875	1376	1070	1490	1160	1394
18	1763	1688	1725	1620	1774	1714
19	1750	1426	1594	1269	1237	1455
20	1110	1126	1236	1078	1176	1146
21	3056	2240	2307	2891	2625	2624
22	1068	1124	1096	1054	1040	1076
23	1644	1544	1666	1576	1320	1550

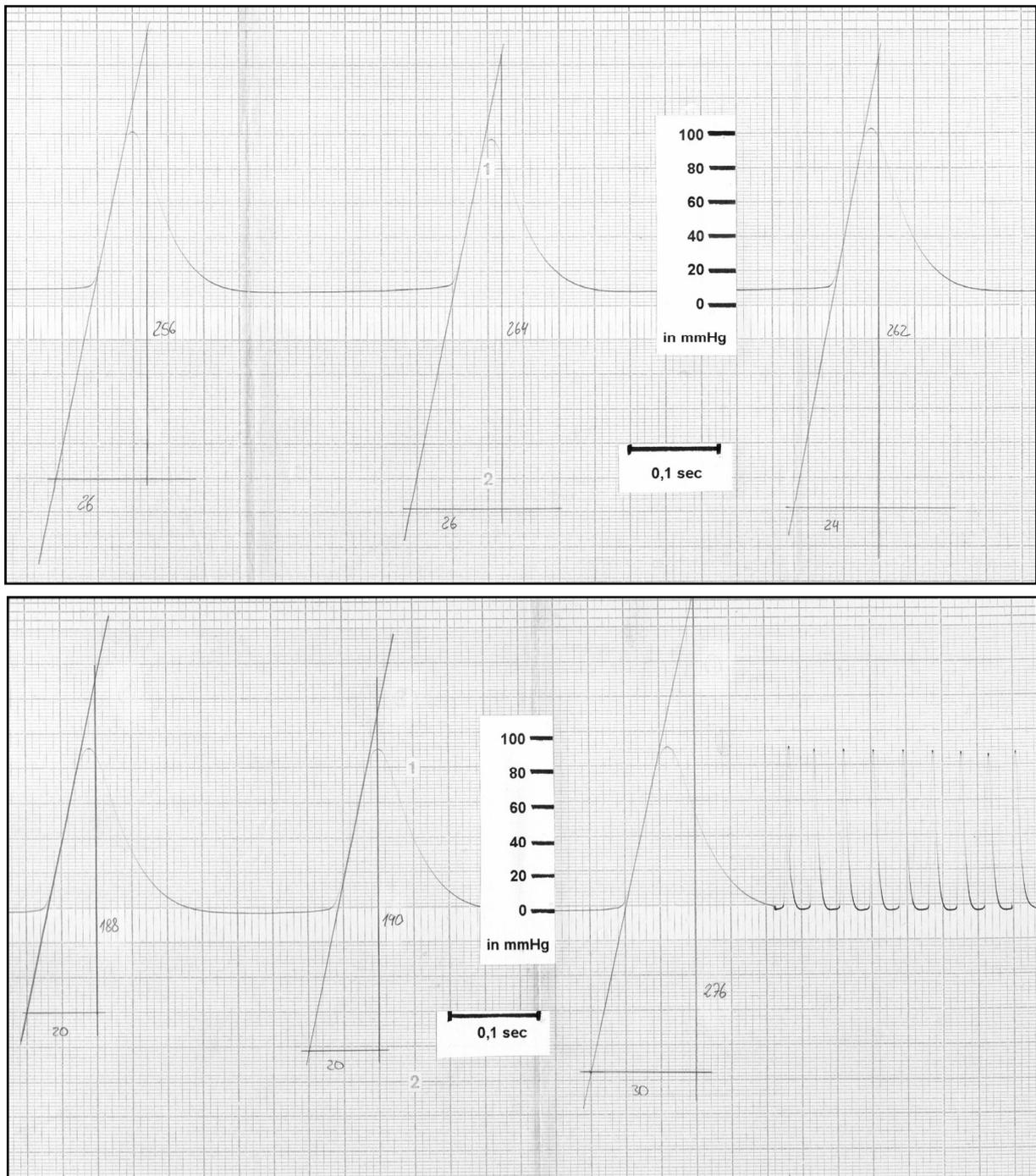
Maus	Frequenz beats / min	P max in mmHg	dP/dt Mittel in mmHg/sec.	
unbehandelt	1	344	58	1374
	2	300	52	2554
	3	207	42	2252
	4	250	45	2784
	5	143	43	1634
	6	176	41	2254
	7	194	53	2966
	8	390	59	3282
	9	219	46	3296
	10	-----	55	-----
	11	251	47	1796
	12	189	76	3032
	13	162	64	1897
	14	220	75	3671
	15	204	85	2717
	16	184	75	3396
	17	300	84	3236
	18	362	83	3300
	19	396	69	2609
	20	207	73	2194
	21	216	85	2669
	22	188	84	1844
Kontroll-PBLs	1	292	45	1979
	2	191	64	2884
	3	127	49	2742
	4	168	50	2122
	5	161	57	2068
	6	229	63	2141
	7	229	66	2787
	8	230	55	2641
	9	196	80	1946
	10	278	50	2858
	11	328	50	2958
Inf-KMP-PBLs	1	225	41	1108
	2	366	39	1139
	3	290	44	1006
	4	172	46	1174
	5	291	62	1788
	6	108	43	1257
	7	292	41	1336
	8	237	52	1289
	9	281	33	1516
	10	263	37	1184
	11	260	42	1171
	12	220	47	1081
	13	162	75	2474
	14	354	74	2419
	15	182	81	2681
	16	169	70	1595
	17	168	23	1394
	18	161	58	1714
	19	244	56	1455
	20	375	29	1146
	21	214	82	2624
	22	356	28	1076
	23	264	38	1550

**Tabelle 15:**

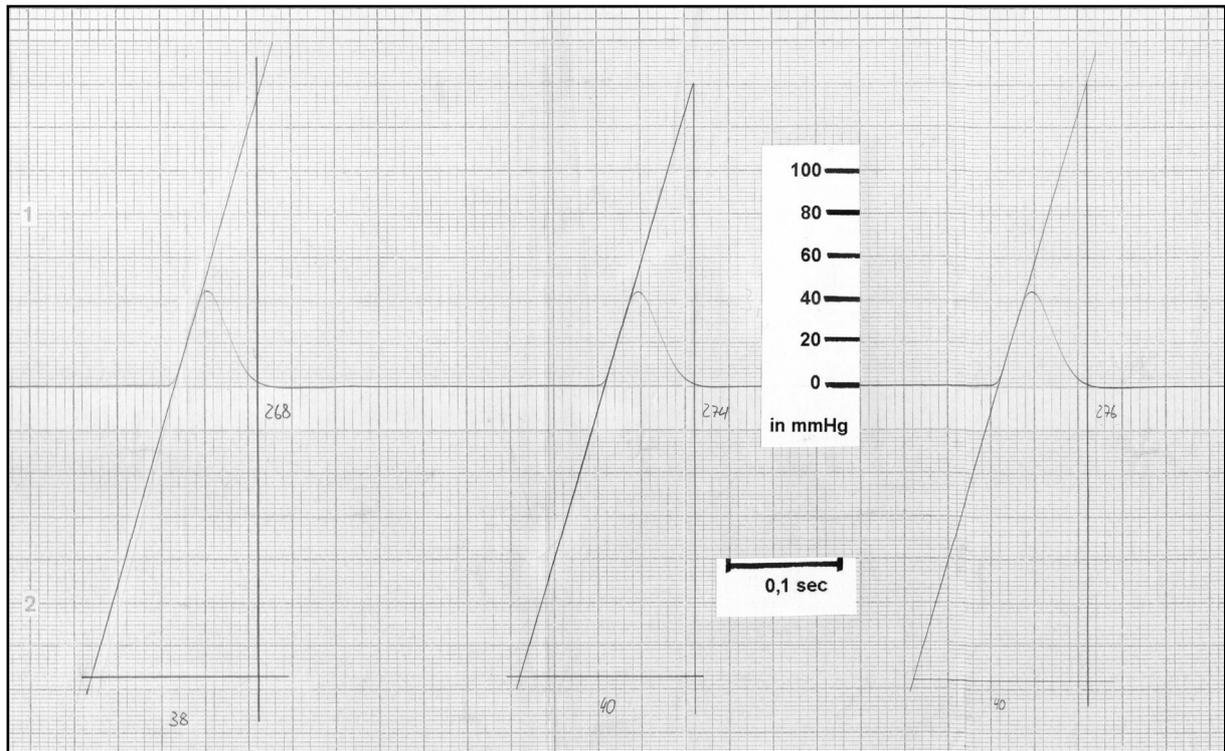
Werte der gemessenen links-ventrikulären Frequenzen und maximalen Drücke im steady state für jede SCID-Maus nach Punktion des linken Ventrikels.



**Abbildung 14a,b:** Darstellung der über mindestens fünf aufeinanderfolgende Zyklen im steady state gemittelten linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeiten und Ventrikeldrücke für die einzelnen Mäuse 60 Tage post Transfer.



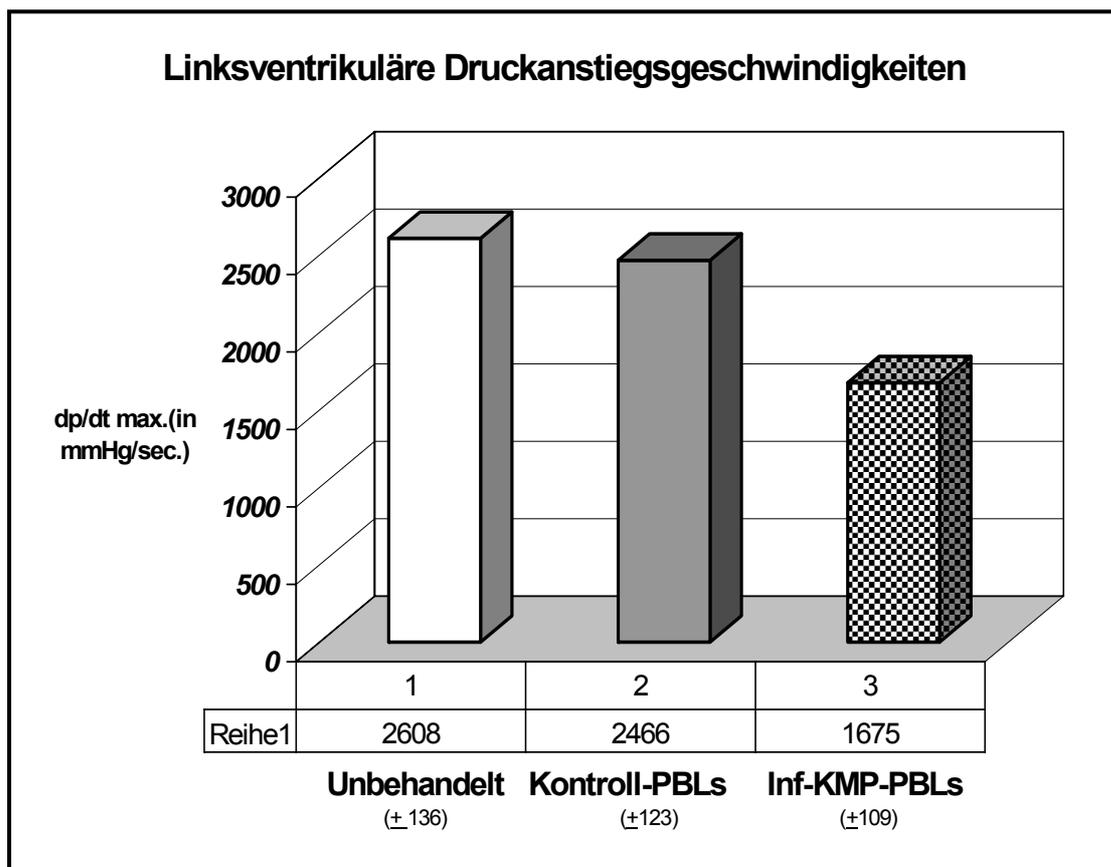
**Abbildung 15a,b:** Repräsentative Beispiele für die Messung der linksventrikulären Drücke in SCID-Mäusen nach direkter Punktion des linken Ventrikels. Es handelt sich um die Mäuse „Unbehandelt 21“ oben und „Kontroll-PBLs 6“ unten. Dargestellt sind das Anlegen von Tangenten an den jeweiligen Kurvenaufstrich zur nachfolgenden Berechnung der Druckanstiegsgeschwindigkeiten  $dp/dt$ . Der Papiervorschub betrug 250 mm/Sekunde. Abbildung 15b zeigt im rechten Drittel eine Sequenz mit einem Papiervorschub von 25 mm/Sekunde.



**Abbildung 15c:** Repräsentatives Beispiel für die Messung der linksventrikulären Drücke in SCID-Mäusen nach direkter Punktion des linken Ventrikels. Es handelt sich um Maus „Inf-KMP-PBLs 18“. Dargestellt sind das Anlegen von Tangenten an den jeweiligen Kurvenaufstrich zur nachfolgenden Berechnung der Druckanstiegsgeschwindigkeiten  $dp/dt$ .

**Tabelle 16:** Durchschnittswerte der linksventrikulären hämodynamischen Parameter

	Ventrikeldrücke (mmHg)	Herzfrequenzen (Schläge/min)	dp/dt max. (mmHg/sec.)
<i>Unbehandelte Mäuse</i>	63 ( $\pm 3,4$ )	243 ( $\pm 20$ )	2608 ( $\pm 136$ )
<i>Mäuse mit Kontroll-PBLs</i>	57 ( $\pm 3,1$ )	221 ( $\pm 18$ )	2466 ( $\pm 123$ )
<i>Mäuse mit Inf-KMP-PBLs</i>	50 ( $\pm 3,6$ )	246 ( $\pm 15$ )	1675 ( $\pm 109$ )

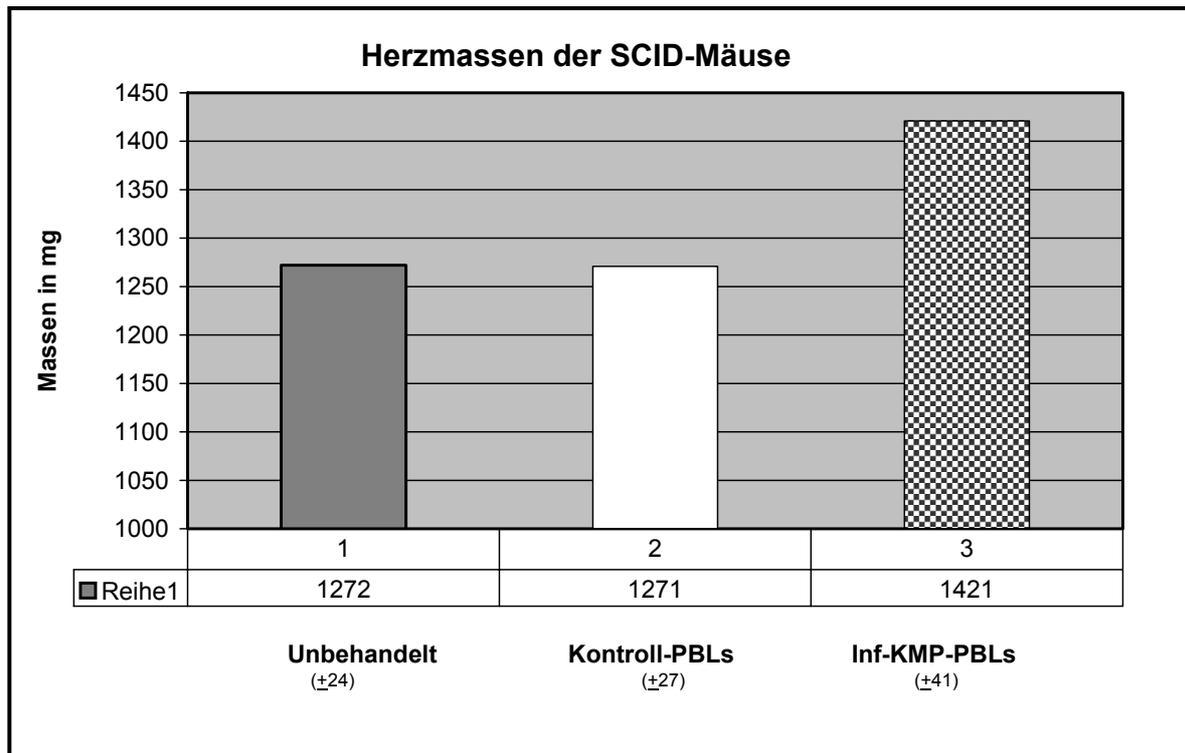
**Abbildung 16:** Durchschnittliche linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeiten der SCID-hu-PBL-Mäuse 60 Tage nach Rekonstitution mit humanen PBL's.

### III.8 Gewichte der Mäuseherzen

Bei der Untersuchung, ob sich die von den Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie bekannten autoimmunologischen Phänomene und links-ventrikulären Funktionsstörungen in den SCID-Mäusen reproduzieren lassen, wurde auch der Frage nachgegangen, ob es bei den Herzen der Mäuse, denen PBL's von erkrankten Spendern injiziert worden waren, zu einer Zunahme der Herzmassen gekommen war. Zwischen der bei Patienten mit MC und/oder DCM bekannten Vergrößerung der Herzen mit oft gleichzeitig einhergehender Gefügedilatation und der Zunahme der Herzmasse besteht ein nachgewiesenermaßen direkter Zusammenhang<sup>(129)</sup>. Der Durchschnitt betrug bei den Herzen, die unbehandelten Kontrollmäusen entnommen worden waren, 1272 ( $\pm$  24) mg, bei den Herzen, die Mäusen mit transferierten Zellen von gesunden Spendern entnommen worden waren, 1271 ( $\pm$  27) mg, und bei Tieren mit transferierten Zellen von erkrankten Spendern 1421 ( $\pm$  41) mg. Zwischen den Werten von unbehandelten Kontrollen und den Werten von „Kontroll-PBLs“-Mäusen gab es somit keinen Unterschied, der Unterschied zwischen den Herzen der Tiere dieser beiden Gruppen und denen von Mäusen, die mit Zellen von erkrankten Spendern rekonstituiert worden waren, war dagegen deutlich. Die Einzelwerte der Herzmassen sind in Tabelle 17, die Durchschnittswerte der drei Tiergruppen nochmals in Abbildung 17 dargestellt.

**Tabelle 17:** Einzelwerte der Massen der SCID-Mäuseherzen in Milligramm.

<i>Unbehandelt 1</i>	<i>n.b.</i>	<i>„Kontroll-PBLs“ 1</i>	1307	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 1</i>	<i>n.b.</i>
<i>Unbehandelt 2</i>	<i>n.b.</i>	<i>„Kontroll-PBLs“ 2</i>	1178	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 2</i>	<i>n.b.</i>
<i>Unbehandelt 3</i>	<i>n.b.</i>	<i>„Kontroll-PBLs“ 3</i>	1245	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 3</i>	<i>n.b.</i>
<i>Unbehandelt 4</i>	<i>n.b.</i>	<i>„Kontroll-PBLs“ 4</i>	1232	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 4</i>	<i>n.b.</i>
<i>Unbehandelt 5</i>	1297	<i>„Kontroll-PBLs“ 5</i>	1189	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 5</i>	<i>n.b.</i>
<i>Unbehandelt 6</i>	1245	<i>„Kontroll-PBLs“ 6</i>	1402	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 6</i>	1473
<i>Unbehandelt 7</i>	1227	<i>„Kontroll-PBLs“ 7</i>	1203	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 7</i>	1278
<i>Unbehandelt 8</i>	1318	<i>„Kontroll-PBLs“ 8</i>	1235	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 8</i>	1438
<i>Unbehandelt 9</i>	1178	<i>„Kontroll-PBLs“ 9</i>	1196	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 9</i>	1325
<i>Unbehandelt 10</i>	1124	<i>„Kontroll-PBLs“ 10</i>	1419	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 10</i>	1220
<i>Unbehandelt 11</i>	1235	<i>„Kontroll-PBLs“ 11</i>	1378	<i>„Inf-KMP-PBLs“ 11</i>	1195
<i>Unbehandelt 12</i>	1214			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 12</i>	1319
<i>Unbehandelt 13</i>	1168			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 13</i>	1485
<i>Unbehandelt 14</i>	1302			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 14</i>	1610
<i>Unbehandelt 15</i>	1212			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 15</i>	1143
<i>Unbehandelt 16</i>	1405			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 16</i>	1412
<i>Unbehandelt 17</i>	1260			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 17</i>	1580
<i>Unbehandelt 18</i>	1315			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 18</i>	1466
<i>Unbehandelt 19</i>	1318			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 19</i>	1456
<i>Unbehandelt 20</i>	1356			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 20</i>	1715
<i>Unbehandelt 21</i>	1287			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 21</i>	1281
<i>Unbehandelt 22</i>	1438			<i>„Inf-KMP-PBLs“ 22</i>	1780
				<i>„Inf-KMP-PBLs“ 23</i>	1400



**Abbildung 17:** Darstellung der durchschnittlichen Herzmassen der SCID-Mäuse, getrennt nach unbehandelte Kontrollen, Tieren mit Kontroll-PBLs und Tieren mit Inf-KMP-PBLs.

### III.9 Korrelation der hämodynamischen Werte und der humanen lymphozytären Infiltrate im Myokard mit anderen Parametern der SCID-Maus

Bei der qualitativen Korrelation von Häufigkeiten des verstärkten Auftretens humaner T-Lymphozyten im Myokard ( $\geq 0,7$  Zellen/10 Gesichtsfelder) mit dem Auftreten von erhöhten humoralen Parametern im Serum der SCID-hu-PBL-Maus fand sich eine statistisch ( $\chi^2$ -Test) signifikante Korrelation zwischen den humanen T-Lymphozyten im Myokard und den humanen ANT-spezifischen IgG-Autoantikörpern ( $p < 0,025$ ), dem humanen Interleukin-6 ( $p < 0,05$ ) und dem sIL-2-Rezeptor ( $p < 0,05$ ), nicht jedoch mit dem humanen Interleukin-8. Bei den Serumparametern wurden als Grenzwerte (Kriterium „erhöht“) die durchschnittlichen Spiegel aller Mäuseseren, die mit humanen Zellen -egal welcher Herkunft- rekonstituiert worden waren, angenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18a dargestellt.

**Tabelle 18a:** Korrelation der Häufigkeiten verstärkter humaner lymphozytärer Infiltrate im Myokard mit erhöhten humanen humoralen Parametern im Serum der SCID-hu-PBL-Maus 60 Tage nach Transfer.

Humane lymphozytäre Infiltrate im Myokard ( $\geq 0,7$ Zellen)	Anzahl untersuchter Herzen	Human IgG-anti ANT im Serum nachweisbar (O.D. $\geq 0,1$ )	Human-IL-6 im Serum nachweisbar ( $\geq 7$ pg/ml)	Human-sIL-2-R im Serum nachweisbar ( $\geq 90$ pmol/l)	Human-IL-8 im Serum nachweisbar ( $\geq 80$ pg/ml)
<i>ja</i>	16	75% (12/16)	63% (10/16)	63% (10/16)	44% (7/16)
<i>nein</i>	7	28% (2/7)	14% (1/7)	14% (1/7)	43% (3/7)
Signifikanzniveau ( $\chi^2$ - Test)		$p < 0,025$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	nicht signifikant

Bei der qualitativen Korrelation von Häufigkeiten des Auftretens erniedrigter linksventrikulärer Druckanstiegsgeschwindigkeiten ( $< 1750$  mmHg/sec.) mit Häufigkeiten verstärkten Auftretens humaner T-Lymphozyten im Myokard

( $\geq 0,7$  Zellen/10 Gesichtsfelder) bzw. mit Häufigkeiten des Auftretens erhöhter humoraler Parameter im Serum der SCID-hu-PBL-Maus fand sich eine statistisch ( $\chi^2$ -Test) signifikante Korrelation zwischen dem Kontraktilitätsmaß und den humanen T-Lymphozyten im Myokard ( $p < 0,01$ ), sowie dem solublen IL-2-Rezeptor ( $p < 0,05$ ), nicht jedoch mit humanen ANT-spezifischen IgG-Autoantikörpern, mit humanem IL-6 und mit humanem IL-8. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18b dargestellt.

**Tabelle 18b:** Korrelation der Häufigkeiten erniedrigter linksventrikulärer Druckanstiegsgeschwindigkeiten der SCID-hu-PBL-Mäuseherzen mit Häufigkeiten des Auftretens verstärkter humaner lymphozytärer Infiltrate im Myokard der Mäuse bzw. mit Häufigkeiten erhöhter humaner humoraler Parameter im Serum der Mäuse.

<b>Erniedrigte Linksventrikuläre Druckanstiegs- Geschwindigkeit (<math>&lt; 1750</math> mmHg/sec.)</b>	<b>Anzahl untersuchter Herzen</b>	<b>Humane Lymphozytäre Infiltrate im Myokard (<math>\geq 0,7</math> Zellen)</b>	<b>Human-IgG anti-ANT im Serum nachweisbar (O.D. <math>\geq 0,1</math>)</b>	<b>Human-IL-6 im Serum nachweisbar (<math>\geq 7</math> pg/ml)</b>	<b>Human IL-8 im Serum nachweisbar (<math>\geq 80</math> pg/ml)</b>	<b>Human-s-IL-2- im Serum nachweisbar (<math>\geq 90</math> pmol/l)</b>
<b>ja</b>	<b>18</b>	<b>78% (14/18)</b>	<b>67% (12/18)</b>	<b>45% (8/18)</b>	<b>56% (10/18)</b>	<b>67% (12/18)</b>
<b>nein</b>	<b>5</b>	<b>20% (1/5)</b>	<b>60% (3/5)</b>	<b>40% (2/5)</b>	<b>60% (3/5)</b>	<b>20% (1/5)</b>
<b>Signifikanzniveau (<math>\chi^2</math> - Test)</b>		<b><math>p &lt; 0,01</math></b>	<b>nicht signifikant</b>	<b>nicht signifikant</b>	<b>nicht signifikant</b>	<b><math>p &lt; 0,05</math></b>