

Aus dem Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Leiter: Prof. Dr. P. Cramer

Untersuchungen apoptoseinduzierender
und costimulatorischer Signalwege
im xenogenen System:
Wechselwirkungen zwischen porcinen
Endothelzellen und humanen Jurkat-Zellen

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von
Caroline Rattenhuber
aus
Starnberg

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Hallek
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. W. Erl Prof. Dr. G. Enders
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. U. Hacker
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	16.03.2006

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Michael Hallek betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 07.04.2006

Caroline Rattenhuber

On met longtemps à devenir jeune

PABLO PICASSO

Die vorliegenden Studien wurde im Zeitraum von Mai 1998 bis Januar 2001 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Michael Hallek am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	v
1 Einleitung	7
1.1 Xenotransplantation	7
1.1.1 Xenotransplantation: Potentielle Entwicklungsmöglichkeiten	7
1.1.2 Historischer Überblick über die Transplantation von xenogenem Gewebe in den Menschen	9
1.1.3 Wahl der geeigneten Spezies	10
1.1.4 Abstoßung.....	11
1.1.5 Xenozoonosen.....	15
1.1.6 Metabolische und funktionelle Inkompatibilität	18
1.2 Strategien zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen	19
1.3 Auswirkungen der Interaktion Fas/FasL.....	20
1.4 Erfahrungen mit dem Einsatz FasL-transgener Transplantate	23
1.5 Überwindung der Abstoßung FasL-transgener Transplantate.....	25
1.6 Costimulatorische Effekte: Die Rolle des B7/CD28-Signalwegs	26
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	27
2 Material und Methoden.....	28
2.1 Material	28
2.1.1 Einwegmaterial	28
2.1.2 Verwendete Lösungen und Medien.....	28
2.1.3 Radiochemikalien.....	30
2.1.4 Geräte.....	30
2.1.5 Antikörper, Markierungen, Fusionsproteine und Isotypen.....	31
2.1.6 Zelllinien.....	32
2.1.7 Bakterien.....	33
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Zellkultur	33
2.2.2 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).....	36
2.2.3 Nachweis von FasL	37
2.2.4 Einsatz von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren.....	37
2.2.5 Nachweis von B7	37

2.2.6	Blockade des B7/CD28-Signalwegs mit CTLA4-IgG	37
2.2.7	Apoptose Assays	38
2.2.8	Plasmidvervielfältigung in <i>E. coli</i>	39
2.2.9	Transiente Transfektion von PEC-A	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Nachweis von FasLigand	44
3.1.1	Nachweis von FasL mit anti-FasL-Antikörpern	44
3.1.2	Nachweis von FasL mit einem Fusionsprotein	48
3.1.3	Verhinderung der Abspaltung von FasL	50
3.2	Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen.....	51
3.2.1	Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen durch Antikörper im JAM-Test.....	51
3.2.2	Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen durch PEC und PEC-A im JAM-Test....	52
3.2.3	Durchflußzytometrische Apoptosemessungen mit Annexin	54
3.2.4	Durchflußzytometrische Apoptosemessungen mit APO2.7	55
3.3	B7-CD28	55
3.3.1	Durchflußzytometrischer Nachweis von B7	55
3.3.2	Blockade von B7/CD28 in der Kokultur von PEC mit Jurkat-Zellen.....	57
3.4	Transfektion von PEC-A	58
3.4.1	Transfektion von PEC-A in Suspension	58
3.4.2	Transfektion von adhärenenten PEC-A	58
4	Diskussion	63
4.1	Nachweis von FasL auf HAEC.....	63
4.2	Nachweis von FasL auf PEC und PEC-A	63
4.3	Apoptosemessungen nach Kokultur von Jurkat-Zellen mit PEC oder PEC-A	65
4.4	Transfektion von PEC-A mit FasL	67
4.5	Aktivierung humaner T-Zellen im xenogenen System	70
4.6	Zusammenfassung.....	72
4.7	Ausblick.....	73
5	Literaturverzeichnis	74
6	Abkürzungen	89
	Danksagung.....	92
	Lebenslauf.....	93

1 Einleitung

1.1 Xenotransplantation

1.1.1 Xenotransplantation: Potentielle Entwicklungsmöglichkeiten

Die Organtransplantation stellt gegenwärtig die einzige kurative Maßnahme für viele Erkrankungen dar, die mit einem Organversagen einhergehen. Derzeit kann durch die limitierte Zahl an Spendern nur fünf bis sechs Prozent des Bedarfs an Organen abgedeckt werden. Von den erfolgreich verpflanzten Alлотransplantaten sind 50% nach zehn Jahren als Folge der chronischen Abstoßung nicht mehr funktionsfähig [1]. Auf der Warteliste für ein Organ sterben jeden Tag mindestens zehn Menschen [2].

Eine Lösungsmöglichkeit könnte die Xenotransplantation (die Transplantation tierischer Organe auf den Menschen) bieten. Erste Versuche auf diesem Gebiet wurden bereits in den sechziger Jahren unternommen. Es zeigte sich allerdings, dass Organe innerhalb kürzester Zeit im Rahmen einer hyperakuten Abstoßungsreaktion zerstört wurden. Dies war der Grund, weshalb die Xenotransplantation kaum mehr weiter verfolgt wurde. Die Erfolge der Gentechnik ließen neue Hoffnung aufkeimen. Durch gezielte genetische Eingriffe könnte es möglich werden tierische Organe so zu verändern, dass die Abstoßungsreaktion durch das menschliche Immunsystem verhindert werden kann. Ein Vorteil gegenüber menschlichen Alлотransplantaten besteht darin, dass Tiere genetisch manipulierbar sind und die gesetzlichen Rahmenbedingungen hierfür gegeben sind [3]. Es besteht die Möglichkeit genetisch veränderte Tiere im benötigten Ausmaß zu züchten um die Organknappheit zu beheben. Der Transplantatmangel bei Kindern ist besonders groß. Hier könnten jüngere Tiere verwendet werden, deren Organe eine passende Größe hätten und die sich der körperlichen Entwicklung anpassen würden [4]. Ferner könnten auch eine Reihe anderer Probleme, die mit der Transplantation menschlicher Organe verbunden sind, gelöst werden. Dazu gehört die Vermeidung der kontroversen Diskussion über den Todeszeitpunkt und die Notwendigkeit der künstlichen Beatmung nach Eintritt des Todes. Zudem bestünde keine Notwendigkeit der Lebendspende mit den damit verbundenen Problemen, seien es mögliche Abhängigkeitsgefühle des Organempfängers vom Spender, gesundheitliche Gefahren für den Organspender oder der ethisch äußerst verwerfliche Handel mit menschlichen Organen [4]. Der Einfluss verschiedenartigster pathophysiologischer Konsequenzen des Gehirntodes und des Gesundheitszustandes des Spenders auf ein Organ wären nicht mehr relevant. Auch wenn

letztendlich keine genaueren Informationen über die systemischen Effekte des Hirntods vorhanden sind, wird vermutet, dass eine massive Freisetzung von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Entzündungsmediatoren die frühe und spätere Funktion des gespendeten Organs stark beeinflussen könnte [5]. Derzeit ist nicht vorzusehen, wann ein passendes Organ zur Verfügung stehen wird. Dadurch wird die Planung einer Transplantationsoperation erschwert. Dies könnte durch das Vorhandensein eines passenden Xenotransplantats verhindert werden. Davon würden sowohl Patient als auch das Operationsteam in höchstem Maße profitieren. Die langen physischen und psychischen Belastungen und die oft sogar letalen Wartezeiten für den Patienten würden entfallen. Das Operationsteam müsste nicht mehr unter Zeitdruck zu einem unvorhersehbaren Termin lange Distanzen bewältigen und das benötigte Organ wäre zum passenden Zeitpunkt am passenden Ort. Transportschäden der Organe durch Ischämie, die das Transplantatüberleben empfindlich beeinflussen und höchstwahrscheinlich sogar für den Prozess der chronischen Abstoßung mitverantwortlich sind, könnten verhindert werden. Bei der Verwendung von Allotransplantaten kann mangels Auswahlmöglichkeiten auf die passende Größe oft keine Rücksicht genommen werden [5]. Ein Xenotransplantat würde in gewünschter Größe zur Verfügung stehen. Chronische Organschäden nach Allotransplantation, die bei nicht adäquater Organgröße, vor allem nach Nierentransplantation auftreten, könnten damit vermieden werden. Die Infektion eines Transplantats wird als nicht unerheblich für die chronische Abstoßungsreaktion eingeschätzt. Sie könnte mit pathogenunbelasteten Xenotransplantaten umgangen werden. Durch gezielte genetische Manipulationen von tierischen Organen bestünde die Möglichkeit den Einsatz immunsuppressiver Medikamente mit den damit verbundenen schwerwiegenden Nebenwirkungen zu vermeiden. Gerade bei häufigen Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Morbus Parkinson könnten insulin- bzw. dopaminproduzierende xenogene Zellen einer sehr großen Anzahl von Patienten zur tatsächlichen Heilung und uneingeschränkter Lebensqualität verhelfen [3]. Tier-Spender-Organen scheinen sogar gegen gewisse menschliche Erkrankungen resistent zu sein, die vielleicht für die Zerstörung des ursprünglichen Organs verantwortlich waren. Dazu zählen Autoimmunerkrankungen [3] und chronische Viruserkrankungen [6].

Zudem würden Xenotransplantate möglicherweise nicht nur dazu dienen die normale Funktion eines Organs zu übernehmen, sondern könnten sogar neue Funktionen oder exogene Gene in den Spenderorganismus einbringen. Dies hätte gegenüber den gängigen Methoden der Gentherapie Vorteile. Das neue Gen wäre auf das transplantierte xenogene Organ beschränkt. Außerdem wäre es möglich durch Integration des gewünschten Gens in die

Keimbahn eine ganze Linie von Spendertieren hervorzubringen. Dies würde nicht nur einem, sondern sehr vielen Patienten helfen [7].

1.1.2 Historischer Überblick über die Transplantation von xenogenem Gewebe in den Menschen

1682 wurde einem russischen Adligen nach einer Kalottenfraktur erfolgreich ein Stück eines Hundeschädelknochens transplantiert [8]. 1963/1964 verpflanzte Dr. Keith Reemtsma 13 Schimpansen-Nieren in Menschen, zwölf Patienten überlebten zwischen neun und 16 Tage, ein Patient überlebte neun Monate [9]. Zur gleichen Zeit übertrug Dr. Thomas Starzl sechs Pavian-Nieren in Menschen, die Überlebenszeit betrug zwischen 19 und 98 Tage. Die meisten der Patienten starben an Infektionen [10]. Dr. James Hardy transplantierte 1964 ein Schimpansen-Herz in einen Menschen. Das xenogene Herz war zwei Stunden funktionsfähig [11]. In den Jahren 1969 bis 1974 wurde drei Mal der Versuch der Transplantation einer Schimpansen-Leber auf einen Menschen unternommen. Die Überlebenszeit lag bei weniger als 14 Tagen [12]. 1977 erfolgte nochmals der Versuch einer xenogenen Herztransplantation durch Dr. Christian Barnard, den südafrikanischen Chirurgen, der 1967 die erste allogene Herztransplantation beim Menschen durchgeführt hatte. Er verpflanzte ein Pavian-Herz und ein Schimpansen-Herz in zwei Patienten, die eine erfolglose Herzoperation hinter sich hatten. Die xenogenen Organe sollten als „Brückenorgane“ dienen. Der Empfänger des Pavian-Herzens starb nach sechs Stunden. Der Empfänger des Schimpansen-Herzens überlebte vier Tage [13]. Sieben Jahre später, 1984, transplantierte Dr. Bailey ein Pavian-Herz in ein Frühgeborenes, das als Baby-Fae bekannt wurde. Das Kind war mit einem minderentwickelten linken Herz zur Welt gekommen. Es überlebte 20 Tage mit dem xenogenen Herzen. Es wurde angenommen, dass in erster Linie die Blutgruppeninkompatibilität zwischen Baby-Fae und dem Spender-Pavian die Abstoßung verursachte [14]. 1992 transplantierte ein polnischer Chirurg ein Schweine-Herz in einen Menschen. Dieser starb nach 24 Stunden. Die unzureichende Größe des verpflanzten Herzens, das den menschlichen Blutkreislauf nicht aufrechterhalten konnte, wurde für die Abstoßung mitverantwortlich gemacht [15]. Ein Jahr später verpflanzte Dr. Thomas Starzl eine Pavian-Leber in einen AIDS-kranken, Hepatitis B positiven Patienten. Paviane scheinen gegenüber Hepatitis B und HIV immun zu sein. Der Patient überlebte 70 Tage ohne Anzeichen von Abstoßung. Bei starker immunsuppressiver Therapie erlag er schließlich einer Infektion [16]. 1995 erhielten Wissenschaftler die Erlaubnis porcine (vom Schwein stammende) Neuronen zur Behandlung von an Morbus Parkinson erkrankten Patienten im Bereich des Nucleus

caudatus und des Putamen zu implantieren. Die Phase I Studien zeigten erste Erfolge ohne Sicherheitsbedenken und gingen einige Jahre später in die Phase II über [17]. Es war jedoch kein signifikanter Behandlungserfolg meßbar [18].

Dr. Suzanne Ildstad unternahm 1996 den Versuch der Transplantation von Pavian-Knochenmarkszellen in einen AIDS-kranken Patienten. Da Pavian-Stammzellen vermutlich resistent gegenüber HIV sind, hoffte man, dass die Stammzellen das Immunsystem des Patienten rekonstruieren und HIV kompetente Immunzellen gebildet werden könnten. Die xenogenen Stammzellen wurden allerdings innerhalb von zwei Wochen abgestoßen. Dies geschah zumindest ohne negative Auswirkungen für den Patienten [19].

In den letzten Jahren erfolgten zahlreiche Versuche der Verpflanzung von syn-, allo- oder xenogenem Gewebe in Tiermodellen. Dadurch konnten Grundlagen für die Übertragung von Xenotransplantaten in den Menschen geschaffen werden.

1.1.3 Wahl der geeigneten Spezies

Bezüglich der Wahl der passenden Spezies besteht eine kontroverse Diskussion. Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades ist prinzipiell davon auszugehen, dass Organe von nicht-humanen Primaten bezüglich ihrer Physiologie am besten für den Menschen geeignet sind und die Abstoßungsprobleme geringer sind. Experten sind aber der Meinung, dass die Gefahr der Übertragung humanpathogener Viren ungleich größer ist [20, 21]. Des weiteren erreichen die nicht unter Artenschutz stehenden Primaten wie z. B. Paviane nicht die Körpergröße eines erwachsenen Menschen. Allein diese Größen-Inkompatibilität kann zur Zerstörung des transplantierten Organs führen [22]. 43% der Menschheit haben Blutgruppe 0. Diese stellt bei Pavianen eine extreme Seltenheit dar, was ihren Gebrauch als potentielle Spendertiere wesentlich erschwert [23]. Darüber hinaus sind Primaten nur begrenzt verfügbar und die Aufzucht gestaltet sich schwierig (lange Generationszeit, lange Tragezeit, in der Regel nur ein Nachkomme). Zusätzlich wird ihre Eignung als mögliche Organspender durch Artenschutzerwägungen und ethische Bedenken stark eingeschränkt. In Großbritannien wurde sogar ein Verbot der Transplantation von Primatenorganen auf den Menschen durchgesetzt [24].

Unter den Nicht-Primaten wird derzeit das Schwein als das attraktivste potentielle Spendertier favorisiert. Es ist in großer Zahl einfach zu züchten. Schweine werden mit sechs Monaten geschlechtsreif, haben eine kurze Tragezeit (im Durchschnitt 114 Tage), gebären im Mittel zehn Ferkel und erreichen sehr schnell eine für den erwachsenen Menschen adäquate Größe. Sie können mit relativ geringem Kostenaufwand gezüchtet werden, und dies auch unter

spezifisch pathogenfreien Bedingungen [22]. Ethische Bedenken spielen eine untergeordnete Rolle. Schweine dienen dem Menschen als Nahrungsmittel und sind schon seit einiger Zeit Lieferanten für biologische Herzklappen. Insulin wird zwar mittlerweile gentechnisch hergestellt, wurde aber über 50 Jahre lang aus Schweinen gewonnen und diente Millionen von Diabetikern als Dauermedikation.

Es bleibt zu bedenken, dass Religionen wie beispielsweise der Buddhismus sich prinzipiell dem Gedanken verweigern, Tiere als mögliche Organspender für den Menschen zu akzeptieren. Grundsätzlich sollte das Leid, das Tieren im Rahmen der Xenotransplantationsforschung und deren möglichen Anwendungen zugefügt wird, in einem vertretbaren Verhältnis zu dem erwarteten Nutzen für Kranke stehen. Es sollten in jedem Fall Maßnahmen getroffen werden, dieses Leid möglichst gering zu halten. Eine Hauptforderung liegt darin, die sukzessive Entnahme von Organen aus einem Spendertier zu verbieten, um Tierquälerei durch wiederholtes Narkotisieren und Operieren zu verhindern.

Der entscheidende Nachteil von Schweinen als potentielle Organspender gegenüber Primaten ist die Gefahr der hyperakuten Abstoßung. Spezieskombinationen wie z. B. Schwein-Mensch, die eine hyperakute Abstoßungsreaktion hervorrufen, werden als diskordant bezeichnet, während diejenigen, welche dieses Phänomen nicht zeigen, wie z. B. Primaten untereinander, als konkordant bezeichnet werden [25, 26]. Gerade für das Schwein ist aber die Methodik zur Herstellung transgener Tiere etabliert. Es besteht damit die Möglichkeit humane Gene bleibend in das Genom von Schweinen zu integrieren oder porcine Gene zu entfernen [27]. Auf diese Weise können Schweine auf der Oberfläche ihrer Zellen Faktoren exprimieren, die Abstoßungsreaktionen verhindern oder abschwächen. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die hyperakute Abstoßung durch genetische Manipulation überwunden werden kann [22]. Das Klonen von Schweinen ist möglich [28]. Die Voraussetzungen für die Züchtung geeigneter Schweine für die Xenotransplantation sind damit gegeben.

1.1.4 Abstoßung

Das Hauptproblem der Transplantation von xenogenem Gewebe in den Menschen sind die Abstoßungsreaktionen, die auf Immunreaktionen gegen das transplantierte Gewebe zurückzuführen sind. Biologische Antworten auf xenogenes Gewebe sind die hyperakute Abstoßung, die akute vaskuläre Abstoßung, die zelluläre Abstoßung und die chronische Abstoßung [7].

1.1.4.1 Hyperakute Abstoßung

Die hyperakute Abstoßung ist die stärkste bekannte Immunantwort [7]. Sie basiert auf präexistierenden natürlichen Antikörpern. In der humanen Allotransplantation wird die natürliche Abstoßung durch präexistierende Antikörper mittels Abstimmung der Blutgruppe zwischen Spender und Empfänger verhindert. Xenoreaktive Antikörper erkennen als antigene Struktur Galaktosyl α -1,3-Galaktose (Gal α 1-3Gal), einen auf der Oberfläche einiger Pathogene (Bakterien) erscheinenden Zucker, welcher aber auch von Schweinen synthetisiert wird. Die Produktion dieser Antikörper ist auf die Darmbesiedelung mit Bakterien in der frühen postnatalen Phase zurückzuführen. Durchschnittlich 80% der im humanen Blut zirkulierenden präformierten komplementbindenden xenogenen Antikörpern binden an das Gal α 1-3Gal Antigen [29]. Beteiligt an der hyperakuten Abstoßung sind in erster Linie diese xenoreaktiven Antikörper, das Komplementsystem und die Aktivierung des Spender-Endothels. Dabei führt die Bindung der präformierten xenogenen Antikörper an das diskordante Xenotransplantat zu einer Aktivierung des Komplementsystems auf dem klassischen und alternativen Weg [25]. Durch die Antikörper-Bindung und Komplement-Bindung an das Endothel kommt es zu einer Endothelzellaktivierung ohne Genaktivierung und Proteinsynthese. Diese wird als Endothelzellaktivierung vom Typ I bezeichnet. Auch zellvermittelte Phänomene wie eine Antikörper-unabhängige Endothelzellaktivierung bzw. -zerstörung durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) [30] sind an dieser Art der Abstoßung beteiligt. Die Summe der Prozesse bewirkt Endothelzellschädigung, intravasale Gerinnung und einen Verlust der endothelialen Barrierefunktion mit nachfolgender Ödembildung, Hämorrhagie und zellulärer Infiltration. In der Folge kommt es zu thrombotischen Gefäßverschlüssen, venösen Stauungszeichen, entzündlichen Reaktionen und fokalen Nekrosen mit Ablagerungen von Immunglobulinen, Komplement und Fibrin in der Endstrombahn des Transplantats [31]. Die hyperakute Abstoßung führt zur sofortigen Zerstörung des verpflanzten Organs, ohne dass es seine Funktion übernimmt [25]. Die Prozesse vollziehen sich in einem Zeitraum von wenigen Minuten bis Stunden.

Da diese Art der Abstoßung überwiegend Komplement-vermittelt ist, zielen bisherige Lösungsansätze großteils darauf ab, die überschießende Reaktion des Empfänger-Komplementsystems zu inhibieren. Eine Strategie ist die Generierung hDAF (CD55)-transgener Schweine. Der humane „Decay Accelerating Factor“ (hDAF) verhindert die Aktivierung des humanen Komplementsystems. Gegenwärtig werden präklinische Versuche durchgeführt, in denen Herzen hDAF-transgener Schweine orthotop in Paviane transplantiert werden. Mit diesem Ansatz konnte die hyperakute Abstoßungsreaktion signifikant vermindert

werden und es ließ sich erkennen, dass die Expression menschlicher Transgene auf Schweinezellen problemlos möglich ist. Die genetische Modifikation zeigte keine Auswirkung auf die Gesundheit der Tiere, ihr Wachstum, die sexuelle Reifung und ihre Fortpflanzungsfähigkeit [22, 32-36]. Weitere Möglichkeiten die hyperakute Abstoßung zu verhindern, zielen auf die Ursache des Problems: die Gal α 1-3Gal Antigene und die gegen sie gerichteten xenogenen Antikörper. Kuwaki *et al.* transplantierten Herzen aus α -1,3-Galaktosyltransferase „Knock-Out“ (GalT-KO) Schweinen in immunsupprimierte Baboons und erreichten dadurch eine Überlebenszeit von bis zu 179 Tagen [37]. In einer Studie von Yamada *et al.* überlebte ein Baboon 83 Tage mit der Niere eines GalT-KO Schweins [38].

1.1.4.2 Akute vaskuläre Abstoßung

Wird die hyperakute Abstoßungsreaktion überwunden, kommt es zur akuten vaskulären Abstoßung. Diese wird auch als verzögerte Abstoßung bezeichnet [39, 40]. Sie tritt im diskordanten und konkordanten Modell auf und beginnt innerhalb von 24 Stunden nach Anschluss an die Blutversorgung des Empfängers. Es kommt zu einer Zerstörung des Transplantats in einem Zeitraum von Tagen bis Wochen. Die Gründe für die akute vaskuläre Abstoßung werden kontrovers diskutiert. Der kontinuierlich-fortschreitenden Ablagerung von Antikörpern wird eine zentrale Rolle zugeschrieben. Dabei sind spezifisch gegen das Transplantat gerichtete Antikörper ätiologisch bedeutsam. Zudem wird die Infiltration mit mononukleären Zellen in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet. Soweit immunophänotypisch identifizierbar, handelt es sich hierbei um aktivierte Monozyten und/oder NK-Zellen. Dies bewirkt eine Schädigung und eine direkte und indirekte Aktivierung des Endothels. Es kommt zu Endothelzellprozessen, welche die Hochregulierung von Genen und Proteinsynthese zur Folge haben. Dies wird als Endothelzellaktivierung Typ II bezeichnet. Die Oberflächenveränderung des Endothels führt zur Stimulierung und Proliferation von T Helfer Zellen. Ein weiterer Effekt ist die Veränderung der Balance zwischen Thrombomodulatoren. Dadurch kommt es zu einem prokoagulatorischen Stadium mit Bildung von intravaskulären Thromben [25]. Rieben *et al.* konnten in einem *in vivo* Mausmodell zeigen, dass insbesondere IgG₁-AK an dieser Art der Abstoßung beteiligt sind. Die Bildung der IgG₁-AK ist wiederum von der Aktivierung des Komplementsystems und der Interaktion mit Fc γ RIII auf NK-Zellen abhängig [41].

Therapeutische Ansätze, welche die Splenektomie ohne oder in Kombination mit einer immunsuppressiven Therapie beinhalteten, erwiesen sich in wechselndem Ausmaß als erfolgreich. Die längsten Überlebenszeiten wurden mit dem Einsatz von Cyclophosphamid

erreicht, waren jedoch mit erheblicher Toxizität und Mortalität verbunden. Es werden daher auch andere Ansätze verfolgt, wie z. B. die Induktion der so genannten Akkomodation. In diesem Stadium wird das grundsätzlich mit dem Empfänger inkompatible Transplantat unempfindlich gegenüber Antikörpern und Komplementfaktoren des Empfängers, nachdem diese Komponenten initial vorübergehend ausgeschaltet waren, das heißt wenn die akute vaskuläre Abstoßung verhindert wurde [7]. Eine weitere Möglichkeit zur Überwindung der vaskulären Abstoßung stellt eine transgene Expression von humanen MHC-I Molekülen zur Verminderung der NK-Zell-Aktivierung dar. Aufgrund der wichtigen Rolle von Interleukin 1 (IL-1) für den Verlauf dieser Art der Abstoßung ist auch der Einsatz von Anti-IL-1-Antikörpern oder Anti-IL1-Rezeptor-Antikörpern ein potentiell erfolgsversprechender Weg [42]. Eine Immunapherese und/oder der Einsatz adäquater Immunsuppressiva kann die transplantatspezifische Antikörper-Produktion und damit die akute vaskuläre Abstoßungsreaktion vermindern oder sie sogar völlig verhindern [43].

1.1.4.3 Zell-vermittelte Abstoßung

Xeno- und Allotransplantate rufen eine T-Zell-vermittelte antigenspezifische Immunantwort gegen Fremdantigene auf den Zellen des Spenderorgans hervor. Es wird angenommen, dass vor allem CD4+ T-Zellen, so genannte T-Helfer-Zellen für die zelluläre Abstoßungsreaktion verantwortlich sind. Sie produzieren viele Zytokine. Diese bewirken zusätzlich zur Aktivierung von weiteren CD4+ T-Zellen auch eine Aktivierung von CD8+ T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen. CD8+ T-Zellen verursachen eine direkte Lyse von Spenderzellen. Makrophagen tragen durch Induktion einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion zur Abstoßung des transplantierten Spendermaterials bei, welche durch lösliche Mediatorstoffe wie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und/oder reaktive Sauerstoff-Metaboliten übermittelt wird. Diese Antworten verursachen die Zell-vermittelte Abstoßung, welche ohne Immunsuppression innerhalb von Tagen bis Wochen zur Zerstörung des Transplantats führt [44].

Prinzipiell erwiesen sich die klinisch bekannten Immunsuppressiva (Cyclophosphamid, Cyclosporin A, Mofetil, Leflunomid, Steroide) in mehreren Versuchen als wirksam die zelluläre Abstoßung in xenogenen Modellen zu unterdrücken und das Organüberleben zu verlängern. Die benötigten Dosierungen sowie die notwendigen Kombinationen waren jedoch teilweise mit schweren Nebenwirkungen verbunden [22, 45].

1.1.4.4 Chronische Abstoßung

Die chronische Abstoßung ist die häufigste Ursache für den Verlust von Herz-, Leber- und Nieren-Allotransplantaten. Sie entwickelt sich innerhalb von Monaten bis Jahren. Die genaue Pathophysiologie der chronischen Abstoßung ist noch unklar. Bisherige Untersuchungen beschränken sich auf allogene Modelle. Ob und bis zu welchem Grad eine chronische Abstoßungsreaktion in einem xenogenen Transplantat stattfindet, ist derzeit spekulativ. Die zugrundeliegenden Mechanismen werden kontrovers diskutiert. Die obstruktiven vaskulären Läsionen, die für die chronische Abstoßung typisch sind, scheinen auf einen kontinuierlichen Endothelschaden zurückzuführen zu sein. Dieser wird begleitet von einer Proliferation der glatten Muskulatur. Damit kommt es zu einer Verdickung der Gefäßwand und der allmählichen Obliteration von Lumen. Sowohl Antigen-abhängige als auch Antigen-unabhängige Faktoren führen zur chronischen Abstoßung. Antigen-abhängige Faktoren sind Transplantatveränderungen, welche durch die fortdauernde Konfrontation des Empfängerimmunsystems mit den Spender-Antigenen bedingt sind. Insbesondere eine früh einsetzende akute Abstoßung wird als ein kritischer antigenabhängiger Risikofaktor für die chronische Abstoßung angesehen [46]. Daneben sind auch Antigen-unabhängige Faktoren wie eine prolongierte Ischämiezeit, chirurgische Manipulationen und Perfusions- sowie Reperfusionsschäden an der chronischen Abstoßung beteiligt. Zu den antigen-unabhängigen Faktoren zählen außerdem der Einfluss immunsuppressiver Medikamente, eine Cytomegalie-Virus-Infektion des Transplantats (u. a. verbunden mit einer chronischen Infektion des Empfängers) und die systemischen Effekte des Hirntods. Die chronische Abstoßung führt v. a. bedingt durch Vaskulopathie und interstitielle Fibrose zu einer allmählich zunehmenden Organinsuffizienz [47].

Falls vorwiegend antigenabhängige Prozesse für die chronische Abstoßung verantwortlich sind, würde sich dies eher in xenogenen Transplantaten als in allogenen Transplantaten zeigen, da sich der Empfängerorganismus mit einer größeren Anzahl von Antigenen auseinandersetzen muß. Falls v. a. antigenunabhängige Organschäden eine Rolle bei der chronischen Abstoßung spielen, könnten gerade xenogene Transplantate dazu beitragen, diese Art der Abstoßung zu überwinden [7].

1.1.5 Xenozoonosen

Die Möglichkeit Zoonosen durch transplantierte Xenotransplantate zu übertragen, stellt eine nicht zu unterschätzende Gefahr dar. Das Risiko einer Infektion mit bei Schweinen

vorkommenden Erregern wird von der Wissenschaft übereinstimmend als wesentlich geringer eingeschätzt, als es bei der Transplantation von Primatenorganen der Fall wäre.

Der Mensch lebt seit Jahrhunderten in engem Kontakt mit Schweinen. In Einzelfällen kam es zur Übertragung der Grippe [48, 49] und des Nipah Virus [50]. Bei der Transplantation von porcinen Organen in den Menschen ist die notwendige Immunsuppression des Empfängers allerdings ein zusätzlicher Risikofaktor für die Übertragung von tierischen Erregern. Die Gefahr der Übertragung von Protozoen, Viren, Bakterien und Prionen muss sorgfältig überprüft werden. Onions *et al.* stellten in einer Arbeit heraus, welche Mikroorganismen dabei besonders berücksichtigt werden sollten. Diese sind zwar alle mit bekannten Therapieschemata zu behandeln, es sollte aber möglich sein Schweine in einer spezifisch pathogenfreien Umgebung, zu züchten. Damit wäre es möglich, Epstein-Barr- und Cytomegalie-Virus-freie Xenotransplantate zu übertragen. Diese beiden Viren sind weit verbreitet, Hauptverursacher von chronischen Infektionen des Transplantatempfängers und beteiligt an der Zerstörung von allogenen Transplantaten. Eine Beteiligung des Cytomegalie-Virus an der akuten und chronischen Abstoßung von Allotransplantaten wird vermutet. Gegenüber dem Prototyp der Prionen, der Creutzfeld Jakob Krankheit, scheinen Schweine im Vergleich zu Menschen und anderen Spezies nicht anfällig zu sein [51].

Neben den bekannten Zoonosen liegt das Hauptaugenmerk auf den so genannten PERV (Porcine Endogenous Retro Viruses). Endogene Retroviren sind Retroviren, deren Genom sich im Gegensatz zu exogenen Retroviren während der Evolution in die DNA von Menschen und anderen Säugetieren, wie auch Schweinen, meist in mehrfacher Ausführung, integriert hat. Man nimmt an, dass 0,1-1% der DNA von Säugetieren aus dem Genom von Retroviren besteht [51]. In den letzten Jahren wurden humane Rezeptoren für PERV identifiziert [52] und sensitive Methoden entwickelt um eine Infektion mit PERV nachzuweisen [53]. Porcine endogene Retroviren können in das Genom einiger menschlicher Zellen integrieren und sind *in vitro* in der Lage menschliche Zellen zu infizieren und sich in ihnen zu replizieren [54]. Normalerweise ist der Mensch gegenüber den meisten tierischen Retroviren resistent, denn sie werden auf dem Weg der heterologen Komplementaktivierung lysiert. Eine Untersuchung zeigte jedoch, dass eine einzige Passage eines PERV in menschlichen Zellen ausreicht, um das Virus gegenüber menschlichem Komplement resistent zu machen [55, 56].

Eine retrospektive Studie mit über 160 Patienten aus Russland, die Hauttransplantate von Schweinen erhalten hatten oder die vorübergehend an eine künstliche Leber angeschlossen waren, die mit Leberzellen des Schweins arbeitete, zeigte keine Infektion mit vom Schwein stammenden Erregern im Blut der Patienten. Dabei lagen die Transplantationen bis zu zwölf

Jahre zurück [57]. Auch Blut-Untersuchungen bei Metzgern mit etablierten sensitiven Nachweisverfahren für PERV ergaben keinen Anhalt für eine Infektion mit PERV [58]. Das Risiko einer Virusübertragung scheint also nicht allzu groß zu sein. Es ist allerdings nicht unbedingt vergleichbar, wenn man, wie im Rahmen dieser Studien, nur kurzfristig mit Schweinezellen in Berührung gekommen ist oder ob es sich um ein auf Lebenszeit implantiertes porcines Organ handelt. Auch eine gegebenenfalls notwendige Immunsuppression der Transplantatempfänger wurde dabei nicht berücksichtigt.

Ferner kann es zur Entwicklung chimärer Retroviren kommen. Dies sind Retroviren, die in menschliche Zellen gelangen und durch Rekombination mit einem Virus-Genom in humaner DNA replikationsfähig und damit womöglich pathogen werden könnten [22]. Ein weiteres Risiko stellt die Expression des hDAF-Transgens auf der porcinen Zelloberfläche dar. Dies kann eine generelle Resistenz gegenüber dem Komplement-System des Empfängers vermitteln und damit eine Freisetzung von Retroviren aus transgenen Schweineorganen begünstigen [27, 55].

Derzeit werden mögliche Gefahren durch die Übertragung von PERV und anderen Zoonosen kontrovers diskutiert. Lösungsmöglichkeiten bieten die Verwendung von Gen-„Knock-Out“-Techniken zur Ausschaltung von PERV, die Züchtung PERV-freier Schweine oder die Expression eines Transgens, welches in der Lage ist, die Transkription von PERV zu verhindern [7]. Eine Alternative hierzu wäre der eindeutige Nachweis der Apathogenität von PERV für den Menschen [51] oder das Vorhandensein eines effektiven Impfschutzes [59]. Optimal wäre der Einsatz von PERV-freien porcinen Organen. Eine Arbeit von Lu *et al.* gibt Hoffnung, dass PERV-freie Schweine existieren [60].

Vor dem Einsatz der Xenotransplantation sollten unbedingt folgende Fragen geklärt sein: Können PERV humane Zellen *in vivo* infizieren? Können PERV oder andere Mikroorganismen die Empfänger von xenogenen Transplantaten infizieren? Können sie generell eine Krankheit im Menschen und im Transplantatempfänger im Speziellen hervorrufen? Können sie von einem Individuum auf ein anderes übertragen werden? Können sie eine Epidemie auslösen? [61, 62]. Vor diesem Hintergrund wurde vorgeschlagen, international einheitliche Regelungen für die Xenotransplantation zu schaffen. Eine weltweite Organisation, der alle geplanten Anwendungen der Xenotransplantation zur Genehmigung vorzulegen sind und die die getroffenen Vereinbarungen überwacht, wäre in diesem Zusammenhang denkbar [63].

1.1.6 Metabolische und funktionelle Inkompatibilität

Es ist anzunehmen, dass einige xenogene Proteine und Hormone speziesspezifisch sind. Das bedeutet, dass die biologische Funktion in einem humanen System nicht gegeben sein könnte. Je geringer der Grad der Proteinsequenzhomologie ist, desto unwahrscheinlicher ist es auch, dass Stoffwechselforgänge unterschiedlicher Spezies kompatibel sind [64].

Bisher gibt es nur begrenzte Informationen darüber, wie gut ein xenogenes Organ seine Funktion erfüllt. Dabei ist sicher entscheidend, welches Organ transplantiert wird. Die klinische Xenotransplantation einer Leber in diskordanter Konstellation (Schwein auf Mensch) muss aufgrund der zahlreichen möglichen physiologischen Inkompatibilitäten weitaus skeptischer eingeschätzt werden als eine Xenotransplantation von Herz oder Niere. Patienten mit fulminantem Leberversagen konnten allerdings schon erfolgreich mit einer extrakorporalen Schweine-Leber behandelt werden [65]. Leberzellen eines Schweines sind also zumindest vorübergehend dazu in der Lage die metabolische Funktion einer menschlichen Leber zu übernehmen [66]. Die erfolgreiche Verpflanzung einer transgenen Schweine-Niere in einen Makaken zeigte, dass eine Schweine-Niere grundsätzlich ihre Funktion in einem Primaten erfüllen kann. Die dabei aufgetretene renale Anämie konnte durch die exogene Gabe von rekombinantem Erythropoetin überwunden werden [67]. Schweine-Hezen sind zumindest kurzfristig in der Lage, einen sich überwiegend in vertikaler Position befindlichen Pavian am Leben zu erhalten und ermöglichen ihm eine annähernd normale körperliche Aktivität. Kardiovaskuläre Parameter von Schweinen, deren Größe mit der eines erwachsenen Menschen vergleichbar ist, sind weitgehend kompatibel [68]. Eine Studie von Daggett *et al.* [69] zeigte, dass die Lunge eines Schweines kurzzeitig dazu in der Lage ist, Oxygenierung und Gasaustausch in einem nicht-humanen Primaten aufrechtzuerhalten.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass transplantierte xenogene Zellen in ihrer neuen Umgebung nicht die notwendigen Informationen erhalten. Porcines Insulin, Glykogen, Adrenalin und Wachstumshormon sind immerhin den menschlichen Mediatoren so ähnlich, dass sie funktionsfähig sind [63]. Ein Beispiel für das fehlende Zusammenwirken von humanen Proteinen mit porcinen Zellen in einem humanen System ist die mangelnde Regulierung durch das humane Komplementsystem. In gleicher Weise könnte auch das humane Gerinnungssystem nicht in der Lage sein, adäquat mit porcinen Endothelzellen zu interagieren. Dies könnte zu thrombotischen Ereignissen im Transplantat und im gesamten Organismus führen. Eine Lösungsmöglichkeit bietet die Anwendung von medikamentösen Therapien oder der Gentherapie [7]. In diesem Zusammenhang beobachteten Schulte *et al.*

beim Vergleich des porcinen und des humanen von Willebrand Faktors (vWF) im humanen System eine vermehrte Thrombozytenaggregation beim Einsatz des porcinen vWF. Diese konnte durch Deglykosilierung des porcinen vWF verhindert werden [70].

Die Frage nach der Dauer der Überlebensfähigkeit von tierischen Organen ist noch nicht geklärt. Zuchtschweine können bis zu 20 Jahre und älter werden. Wachstum und Altern verläuft beim Schwein rascher als beim Menschen, könnte aber vielleicht durch den Einfluss des humanen Stoffwechsels verzögert werden. Eine angenommene Funktionszeit porciner Organe von 10-15 Jahren entspräche den derzeit maximal möglichen Überlebenszeiten von renalen und kardialen Allotransplantaten.

1.2 Strategien zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen

Zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen werden bislang immunsuppressive Medikamente systemisch verabreicht. Deren Anwendung hat aber Nachteile. Die Wirkungen sind unspezifisch und zum Teil schwer steuerbar und es treten eine Reihe schwerer systemischer Nebenwirkungen auf (Organtoxizitäten, Gefahr von Infektionen oder Entwicklung von Neoplasien beim Empfänger). Hinzu kommt, dass die Abstoßungsreaktionen dadurch oft nicht überwunden, sondern nur unterdrückt werden und vor allem die chronische Abstoßung nur bedingt aufgehalten werden kann.

Eine Alternative stellt die Induktion von Toleranz gegenüber dem transplantierten Gewebe dar. Toleranz gegenüber einem Transplantat ist ein systemischer immunologischer Status, in dem die Antigene des Spenders als „Selbst“ anerkannt werden und deshalb keine Immunantwort, das heißt keine Abstoßungsreaktion hervorrufen, verbunden mit einer normalen Immunkompetenz des Empfängers. Transplantation von Spender-Knochenmark (KM) kann zu KM-Chimärismus führen und Toleranz gegenüber Spendergewebe im Sinne von Anergie induzieren. Die Verpflanzung von Thymusgewebe des Spenders kann spenderspezifische Toleranz im Empfänger verursachen [25].

Weitere Ansätze zur Toleranzinduktion bietet der Einsatz genetisch veränderter Organe, welche inhibitorische Moleküle exprimieren, die gegen das zelluläre Immunsystem gerichtet sind. Ziel ist dabei vor allem die Toleranz gegenüber T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktionen. Bislang konnten eine Reihe von Liganden und löslichen Zytokinen charakterisiert werden, die in einem derartigen Ansatz im Rahmen der Allotransplantation zu einer verlängerten Überlebenszeit der Transplantate geführt haben [71, 72].

Es gibt wenig Informationen über die Induktion von Toleranz gegenüber Xenotransplantaten. Die Generierung hDAF transgener Schweine und andere genetische Veränderungen, die auf

die Abschwächung der Reaktion gegenüber Gal α 1-3Gal-Epitopen und auf die überschießende Komplementreaktion abzielen, dienen v. a. der Überwindung der hyperakuten und akuten Abstoßung. Der nächste Schritt besteht darin, auch die folgenden Abstoßungsreaktionen abzuschwächen und letztendlich zu überwinden. Analog zur Allotransplantation wird versucht, die zelluläre Abstoßungsreaktion gegenüber Xenotransplantaten durch Entwicklung eines T-Zell-Repertoires, welches nicht mit den Spenderzellen reagiert, zu verhindern. Dies kann durch die Transplantation von KM- oder Thymusgewebe des Spenders [38, 73-75] oder durch Transfusion von Spenderblut [76] in der Prätransplantationsperiode erreicht werden. Einen weiteren Ansatz zur Überwindung von Abstoßungsreaktionen bietet die Depletion xenoreaktiver Lymphozyten [77]. Als erfolgsversprechend gilt auch die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen. Mesenchymale Stammzellen verhindern die T-Zell-Antwort indirekt durch die Modulation von Dendritischen Zellen und direkt durch die Störung der Funktion von NK-, CD4+ und CD8+ T-Zellen. Zudem bewirken sie durch die Produktion von Prostaglandinen, Interleukin 10 und Indoleamine 2,3,-Dioxygenase eine lokale Immunsuppression [78]. Damit sind mesenchymale Stammzellen weniger immunogen als reifes Gewebe. Ferner besteht die Möglichkeit, angreifende Immunzellen durch ein Apoptose-induzierendes Transgen auf Zellen des Xenotransplantats zu eliminieren. Es sind mehrere apoptoseauslösende Oberflächenmoleküle bekannt. Eines davon ist Fas-Ligand (CD95 Ligand) und sein spezifischer Rezeptor Fas (CD95). Fas-Ligand (FasL) bindet an Fas und führt zur Apoptose der Fas-tragenden Zelle. Die Überexpression von FasL auf xenogenen Zellen kann entweder mittels Gentransfer oder durch Verwendung von Organen aus für FasL-transgenen Tieren erreicht werden.

1.3 Auswirkungen der Interaktion Fas/FasL

Humanes Fas (hFas) ist ein 45 kDa großes Oberflächenprotein und gehört der tumor necrosis factor (TNF)/nerve growth factor (NGF)-Rezeptorfamilie an [79]. hFas wird auf vielen Zellen konstitutiv exprimiert. Dies gilt auch für T-Lymphozyten und in besonderem Maße für aktivierte T-Lymphozyten [77]. NK-Zellen zeigen nach ihrer Aktivierung eine Hochregulation von Fas und FasL [80].

Humaner FasLigand (hFasL) ist ebenfalls ein zur TNF/NGF-Familie gehörendes Transmembranprotein (Membran-Glykoprotein), hat ein Gewicht von 40 kDa und besitzt eine Trimer-Struktur. hFasL wird v. a. auf NK-Zellen und auf Lymphozyten, insbesondere auf aktivierten T-Lymphozyten, exprimiert [79]. hFasL läßt sich aber auch auf extralymphatischen Geweben wie Testis, Auge, Plazenta [81] und auf Keratozyten

nachweisen [82]. Außerdem wird hFasL auf vaskulärem Endothel exprimiert und löst in hFas exprimierenden Immunzellen, welche die Gefäßwand attackieren, Apoptose aus [83]. Neben dem Schutz vor immunologisch vermitteltem Zellschaden ist hFasL an der Immunantwort gegenüber Viren und Tumorzellen beteiligt. Durch sein Apoptose-induzierendes Potential fungiert hFasL als immunsuppressives Protein, wahrscheinlich um Gewebe vor immunologisch vermitteltem Schaden zu schützen. hFasL-exprimierende Gewebe scheinen sozusagen ein „Immunprivileg“ zu genießen [81].

Umgekehrt schützen sich einige Tumorzellen durch Expression von FasL vor dem Immunsystem des Patienten und sichern damit ihr Überleben [84, 85]. So exprimieren unter anderem HeLa-Zellen (humane Cervix-Karzinom Zellen) FasL [86].

Die Apoptose-induzierende Eigenschaft der meisten Mitglieder der TNF-Familie erklärt sich durch die Struktur ihrer Rezeptoren (Fas, TNF Typ 1, DR4, DR5). Diese haben alle eine 80 Aminosäuren lange Domäne konserviert, die „Todesdomäne“ genannt wird. Die Bindung von FasL an Fas verursacht eine Trimerisation des Rezeptors Fas. Dadurch kommt es zu einer Rekrutierung von FADD (Fas-Associated Death Domain). FADD bindet an die intrazelluläre Todesdomäne des Fas-Rezeptors. Dies wiederum aktiviert die Bildung von Caspasen, wobei Caspase 8 die Initiator-Caspase darstellt [87]. Es kommt zur Formation eines Caspasekomplexes, genannt DISC (Death Inducing Signaling Complex) [88] und die Apoptose wird in Gang gesetzt [89, 90].

Das Fas/FasL Signal vermittelt nicht nur Apoptose, sondern kann auch andere Effekte verursachen. Die Fas/FasL-Interaktion von T-Lymphozyten führt in einem frühen Stadium der Immunantwort zur Proliferation der T-Zellen und erst in späteren Stadien der Immunantwort zur Apoptose. Fas-Stimulierung induziert also in ruhenden T-Lymphozyten einen costimulatorischen Effekt und in prästimulierten T-Lymphozyten einen apoptotischen Effekt [91]. FasL kann zusätzlich zu proliferativen und apoptotischen Signalen aber auch entzündliche Reaktionen vermitteln. Zunächst wurde allein die lösliche („soluble“) Form des FasL (sFasL) für diesen inflammatorischen Effekt verantwortlich gemacht. Da in so genannten immunprivilegierten Orten wie in Auge und Testis keine Neutrophilen-Aktivierung stattfindet, wurde angenommen, dass FasL in immunprivilegierten Orten nicht abgespalten wird und damit sFasL als potentiell chemotaktischer Faktor für Neutrophile nicht wirksam ist [92]. Es wurde vermutet, dass durch die transgene Expression einer FasL-Mutante, die nicht durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) von der Zelloberfläche abgespalten wird, diese Entzündungsreaktion verhindert würde [93]. Der Einsatz von Matrix-Metalloprotease-Inhibitoren (MMPI) oder FasL-Mutanten erschien deshalb zunächst erfolgsversprechend [72].

In einer Arbeit von Miwa *et al.* konnte allerdings dargestellt werden, dass murine Fibrosarkomzellen, welche stabil mit der membrangebundenen Form von FasL transfiziert wurden, eine Infiltration mit Neutrophilen verursachten, nachdem diese Zellen in die Peritonealhöhle von syngenen Mäusen gespritzt wurden [94]. Hohlbaum *et al.* konnten zeigen, dass Lymphom-Zellen, die nur die lösliche Form von FasL exprimierten, keine Apoptose und keine Neutrophilen-Antwort vermitteln. Die durch membrangebundenen FasL induzierte Entzündungsreaktion wurde nicht durch die Expression von Fas auf den entzündungsvermittelnden Neutrophilen initiiert, denn es wurden auch Fas-defiziente Neutrophile rekrutiert. In dieser Arbeit wurde spekuliert, dass die Stimulation einer Zielpopulation durch mFasL zur Freisetzung von chemoaktiven Faktoren für Neutrophile führt [95]. Die zu beobachtende Neutrophilen-Infiltration war nicht T-Zell-abhängig, denn sie trat auch in Modellen mit SCID-Mäusen auf, welche keine T-Lymphozyten besitzen [92]. Es zeigte sich also, dass nicht die lösliche Form des FasL sondern vielmehr die membranständige Form des FasL eine chemotaktische Wirkung auf Neutrophile ausübte und für die auftretende Entzündungsreaktion verantwortlich war. Mittlerweile geht man sogar davon aus, dass das Ausmaß der auftretenden Entzündungsreaktion mit dem apoptoseinduzierenden Potential in direkter Korrelation steht [94, 95]. Yamaoka-Tojo *et al.* beobachteten, dass die Apoptoseinduktion über den Fas/FasL-Signalweg mit der Sekretion der Chemokine IL-8 und MSP 1 (Monozytenstimulierendes Protein 1) vergesellschaftet ist [96].

Hinsichtlich eines geplanten Einsatzes von FasL als immunregulatorisches Molekül in der Transplantationsmedizin ist neben den beschriebenen unterschiedlichen Wirkungen des Fas/FasL-Signals auch zu bedenken, dass Zellen unterschiedlich auf die Interaktion Fas/FasL reagieren. Dies liegt an der Quantität der Expression von Fas und FasL, an der Abspaltung von FasL und an intrazellulären Faktoren [97]. FasL-Expression auf der Oberfläche von Effektorzellen tötet lokale Fas+ Zielzellen. Danach wird dieses Signal durch Abspaltung von FasL herunterreguliert. Nur solche Zellen, welche besonders empfindlich gegenüber Apoptose sind, weil sie Fas in großer Menge exprimieren, können auch durch sFasL getötet werden. Die Gründe für diese unterschiedliche Kompetenz der Apoptosevermittlung sind noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass mFasL potenter ist, weil er ein verlängertes „Crosslinking“ zwischen Fas und FasL vermittelt. Im Gegensatz dazu würden sFasL/Fas-Komplexe schnell internalisiert und damit die Formation des Apoptose-induzierenden Signalkomplexes verhindert [98]. Gegenüber stark Fas-exprimierenden Zellen reicht ein sFasL-vermitteltes Signal aus, um die Zellen in die Apoptose zu treiben. Schwach Fas+ Zellen reagieren auf ein Signal von mFasL mit Apoptose, sind aber gegenüber sFasL resistent.

Das zytolytische Potential des membranständigen FasL wird also durch seine Abspaltung verringert. Löslicher FasL inhibiert sogar die Zytotoxizität von mFasL. Die Tatsache, dass das über mFasL-vermittelte zytolytische Potential einer Zelle durch Abspaltung von mFasL beendet wird, lässt darauf schließen, dass FasL-induzierter Zelltod eine lokale Reaktion darstellt. Der physiologische Hintergrund für diesen Mechanismus besteht vermutlich darin, gesunde Nachbarzellen vor unbeabsichtigter Apoptose zu schützen [98]. Die Störung dieses Kreislaufs, z. B. durch Verwendung von FasL-Mutanten in FasL-transgenen Transplantaten, die nicht mehr durch MMPI von der Zelloberfläche abgespalten werden können, unterbricht diese empfindliche Regulation und könnte vielleicht zu unerwarteten und schädlichen Nebenwirkungen führen. Es scheint demnach im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz von FasL von großer Wichtigkeit zu sein, die richtige Balance zwischen sFasL und mFasL zu finden [93]. Ein zusätzlicher Punkt bei der Betrachtung der durch Fas/FasL-vermittelten Apoptose sind intrazelluläre Komponenten, welche durch Modulation der Formation von DISC die Interaktion Fas/FasL beeinflussen. Eine erhöhte Expression von HIPK3/FIST (Homeodomain-Interacting Protein Kinase 3/FADD Interacting Serine/Threonine Kinase) [99] und PKC (Protein Kinase C) [100] hemmt Fas-vermittelte Apoptose. Ein weiteres Protein welches die Fas-vermittelte Apoptose inhibiert ist FLIP (FLICE Inhibitory Protein) [101]. In einer 2004 erschienenen Arbeit von Bai *et al.* wurde darauf hingewiesen, dass fetale porcine Inselzellen Fas exprimieren, bei der Zugabe von sFasL oder anti-Fas AK aber nicht apoptotisch wurden. Die hohe Expression von FLIP in diesen Zellen wurde für das Ausbleiben der Apoptose verantwortlich gemacht [102]. Die Serin-Threonin Kinase RIP (Receptor Interacting Protein) [103] und DAXX (Death Associated Protein-6) [104] dagegen steigern die Fas-vermittelte Apoptose.

1.4 Erfahrungen mit dem Einsatz FasL-transgener Transplantate

Die bisherigen Ergebnisse beim Einsatz von FasL-transgenen Geweben oder Organen zum Schutz vor Abstoßung sind einerseits ernüchternd aber teilweise auch ermutigend.

Untersuchungen von Seino *et al.* im allogenen murinen Modell zeigten enttäuschende Resultate. FasL-Expression auf murinen Tumorzellen trug durch die Induktion einer Neutrophilen-Infiltration sogar zu einer beschleunigten Abstoßung bei [105]. In einer Studie von Takeuchi *et al.* wurde nachgewiesen, dass FasL-transgene allogene Herzen in Mäusen rascher abgestoßen wurden, als die nicht-transgenen Kontrollherzen. Schon einen Tag nach Transplantation zeigten die FasL-transgenen Herzen Hämorrhagien, Ödeme, und massive

Neutrophilen-Infiltration [106]. Versuche von Kang *et al.* allogenes Pancreas mit fötalem Pancreasgewebe von transgenen Mäusen, welche FasL auf ihren Inselzellen exprimierten, zu transplantieren, scheiterten. Die FasL-Expression auf den Inselzellen resultierte in Neutrophilen-Infiltration und Zerstörung der β -Zellen. Als mögliche Erklärung für die beschleunigte Abstoßung der FasL-transgenen Inselzellen wurde unter anderem ein möglicher „Selbstmord“ der transplantierten β -Zellen diskutiert, bedingt durch die gleichzeitige Expression von Fas und FasL. Diese These wurde widerlegt, da die Neutrophilen-Infiltration durch die Verwendung von Fas-defizienten Empfängermäusen ausgeschaltet werden konnte. Die zu beobachtende Entzündungsreaktion trat also nur in Zusammenhang mit Fas-Expression des Empfängergewebes auf und war nicht von der gleichzeitigen Expression von Fas auf den FasL-transgenen implantierten Zellen abhängig [92]. Buonocore *et al.* beobachteten eine beschleunigte Abstoßung von murinen Haut-Allotransplantaten *in vivo* nach Injektion von FasL-transgenen Dendritischen Zellen bedingt durch eine IL-1-abhängige Aktivierung von Neutrophilen [107].

Andere Arbeiten deuteten auf einen erfolgsversprechenden Einsatz von FasL-transgenen Transplantaten zur Überwindung von Abstoßungsreaktionen hin. Griffith *et al.* kamen zu dem Ergebnis, dass die Expression von FasL auf Strukturen der vorderen Augenkammer das Auge vor aktivierten Immunzellen schützt und eine Erklärung für den immunprivilegierten Status dieser Region darstellt [81]. Für den Erfolg der allogenen Hornhauttransplantation, der bislang erfolgreichsten Verpflanzung von Allotransplantaten im humanen System, machen Stuart *et al.* die Expression von FasL auf der Kornea verantwortlich. Die transplantierte allogene Hornhaut kann sich über den Mechanismus des FasL-induzierten Zelltods vor invasiven Immunzellen des Empfängers und damit vor Abstoßung schützen [108]. George *et al.* wiesen nach, dass die Expression von FasL auf murinen Knochenmarkszellen, die in immuninkompetente neonatale Nager transplantiert wurden, für die Induktion von Toleranz verantwortlich war. Die durch KM-Chimärismus induzierte Toleranz gegenüber dem transplantierten Gewebe war abhängig von der Expression von funktionellem FasL auf den injizierten KM-Zellen [73]. Lau *et al.* konnten zeigen, dass allogene Inselzellen, die zusammen mit FasL-exprimierenden syngen Myoblasten unter die Nierenkapsel transplantiert wurden, nicht abgestoßen wurden und einen normoglykämischen Zustand in - mit Diabetes mellitus erkrankten - Mäusen induzierten. Der Verlust des Transgens für FasL nach 60 Tagen führte zur Abstoßung des Inselzell-Allotransplantats [109]. Seino *et al.* berichteten von einer beschleunigten Abstoßung FasL-transfizierter Leukämiezellen wenn diese in die Haut von Mäusen verpflanzt wurden. Nach Transplantation unter die

Nierenkapsel wurden die Zellen nicht abgestoßen [110]. In einer Studie von Askenasy *et al.* zeigte sich ein verlängertes Überleben FasL-biotinylierter Herzen im syngenem und allogenen Mausmodell, insbesondere konnte das Überleben der Transplantate durch die zusätzliche Behandlung des Empfängers mit intravenös verabreichten FasL-biotinylierten Spender-Splenozyten in der Postimplantationsperiode verlängert werden [111].

Zusammenfassend zeigen diese Arbeiten, dass FasL-transgene Transplantate potentiell einen Schutz vor Abstoßung bewirken können. Im Gegensatz dazu können sie aber auch durch die Induktion einer Neutrophilen-Infiltration zu einer beschleunigten Abstoßung beitragen. Dies scheint unter anderem davon abhängig zu sein, welcher Zelltyp und welcher Situs für die Expression von FasL verwendet wird.

1.5 Überwindung der Abstoßung FasL-transgener Transplantate

Dem Zytokin Interleukin 1 (IL-1) wird bei der Abstoßung FasL-transgener Transplantate eine zentrale Bedeutung zugeschrieben, denn FasL induziert über die Aktivierung von Caspasen die Produktion von IL-1 durch Neutrophile. In so genannten immunprivilegierten Orten wie der vorderen Augenkammer führt die physiologisch hohe FasL-Expression oder der Einsatz FasL-transgener Transplantate nicht zu Entzündungsreaktionen, sondern nur zur Apoptose der einwandernden Entzündungszellen. Es wird angenommen, dass das Fehlen der Entzündungsreaktion auf die Expression eines IL-1-Rezeptorantagonisten in ortständigen Zellen zurückzuführen ist. Folglich wäre es möglich, die proinflammatorische Aktivität von FasL durch die Expression von IL-1-Rezeptorantagonisten zu kontrollieren [94]. Auch das Zytokin IL-17 spielt eine Rolle bei der Fas/FasL-induzierten Entzündungsreaktion. Durch Zugabe eines anti-IL-17-AK konnte die durch FasL-vermittelte Entzündungsreaktion vermindert werden [112]. Ferner wird IL-8 als potentieller Entzündungsvermittler bei Fas/FasL-vermittelter Apoptose angesehen [105]. Demzufolge könnte die Hemmung der IL-8-Bildung oder IL-8-Wirkung die Entzündungsvermittlung durch FasL inhibieren. Eine weitere Möglichkeit, die durch Einwanderung von Neutrophilen induzierte Entzündungsreaktion in FasL-transgenen Transplantaten zu vermindern, besteht in der Koexpression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 [72] und/oder Transforming Growth Factor β (TGF β). TGF β inhibiert die Neutrophilenfunktion. Er ist für den immunprivilegierten Status der vorderen Augenkammer mitverantwortlich, weil er die FasL-induzierte Entzündungsreaktion hemmt. Durch die gleichzeitige Anwesenheit von TGF β bei der subcutanen Injektion FasL+

Kolonkarzinom-Zellen blieb die ohne TGF β aufgetretene entzündliche Antwort auf das FasL-transgene Transplantat aus und das Transplantatüberleben konnte verlängert werden [113].

Durch Beeinflussung der aufgeführten Faktoren wäre es also möglich, die FasL-vermittelte Entzündungsreaktion einzudämmen und die Abstoßung FasL-transgener Transplantate zu verhindern. Abgesehen davon könnte die sorgfältige Auswahl des Transplantatsitus zu einer erhöhten Toleranz gegenüber dem verpflanzten Gewebe beitragen.

1.6 Costimulatorische Effekte: Die Rolle des B7/CD28-Signalwegs

Die volle Aktivierung von T-Zellen benötigt zwei synergistische Signale. Das erste Signal wird über den T-Zell-Rezeptor selbst vermittelt und von Antigenen, die an ein MHC-Molekül gekoppelt sind, ausgelöst. Dieses Signal ist für die Spezifität der Immunantwort verantwortlich. Das zweite Signal ist ein costimulatorisches Signal und ist nicht antigenspezifisch. Fehlt dieses costimulatorische Signal, produzieren die Antigen-aktivierten T-Zellen nicht ausreichend Zytokine, teilen sich nicht und verharren für mehrere Wochen in einem Stadium der Anergie oder werden apoptotisch [44]. Viele T-Zell-Moleküle können als Rezeptoren für costimulatorische Signale dienen, darunter auch CD28. CD28 hat zwei bekannte Liganden, B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). Beide werden auf aktivierten antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. B7-Stimulierung führt zur Proliferation der antwortenden T-Zelle [114]. T-Zellen exprimieren auch CTLA4, ein zu CD28 strukturell ähnliches Molekül, welches ebenfalls an B7-1 und B7-2 bindet. Es vermittelt aber im Gegensatz zu CD28 ein Inhibitionssignal, welches dazu dient, die Immunantwort zu beenden [115]. Humane Dendritische Zellen exprimieren FasL und induzieren Apoptose in Fas⁺Jurkat-Zellen (T-Zell-Lymphom-Zellen). B7⁺/FasL⁺ Dendritische Zellen verursachen erst nach Zugabe von CTLA4-IgG Apoptose in aktivierten T-Lymphozyten. Die Blockade der Interaktion B7/CD28 führt also zu einer Verstärkung der Fas/FasL-vermittelten Apoptose in T-Zellen. Das costimulatorische Signal B7/CD28 verhindert folglich Fas/FasL-vermittelte Apoptosesignale [116]. Bekannt ist, dass Schweineendothelzellen humane T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor aktivieren können und im Gegensatz zu humanen Endothelzellen das Molekül B7 exprimieren [116]. Es konnte gezeigt werden, dass porcines B7 im humanen System funktionell wirksam ist und durch CTLA4-IgG blockiert werden kann [117].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Aktivierung des Endothels im Rahmen der Transplantation stellt ein zentrales Ereignis bei der Initiierung der Abstoßungsreaktionen dar [118]. Im humanen System schützt die Interaktion von hFasL auf vaskulären Endothelzellen und hFas auf angreifenden Immunzellen durch Apoptoseinduktion in den Fas+ Zellen vor Entzündungsreaktionen im perivaskulären Gewebe [83]. Diese Beobachtungen könnten im Hinblick auf die Xenotransplantation von Nutzen sein. Wir vermuteten, dass auch Schweineendothelzellen einen dem hFasL ähnlichen Liganden auf der Oberfläche tragen, um sich vor angreifenden Immunzellen zu schützen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb folgende Fragen zu beantworten:

1. Ist Fas-Ligand auf nativen aortalen Schweineendothelzellen (PEC) und immortalisierten aortalen Schweineendothelzellen (PEC-A) mit einem anti-FasL-AK nachweisbar?
2. Sind PEC und/oder PEC-A in der Lage, in humanen Lymphozyten (Jurkat-Zellen) Apoptose auszulösen? Wenn ja, wird diese Apoptose über den Fas/FasL-Signalweg vermittelt?
4. Ist die Überexpression von hFasL auf PEC-A sinnvoll und stellt sie einen Weg dar Jurkat-Zellen in die Apoptose zu treiben?

PEC und PEC-A exprimieren B7, welches im humanen System funktionell wirksam ist [117, 119]. Da das costimulatorische Signal B7/CD28 ein dem Fas/FasL-Signalweg entgegengesetztes Signal übermitteln kann [116], sollte zusätzlich untersucht werden, ob die Blockade einer möglichen B7/CD28-vermittelten Costimulation die Fas/FasL-vermittelte Apoptose in einer Kokultur von PEC-A mit humanen T-Lymphozyten verstärken kann.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass viele Interaktionen im xenogenen System Schwein/Mensch wirksam sind. Dies kann je nach Wechselwirkung zu einer verstärkten Abstoßungsreaktion gegenüber dem xenogenen Transplantat, aber auch zu einer verminderten, weil kontrollierten oder zumindest kontrollierbaren, Reaktion gegenüber xenogenem Gewebe führen. Nur durch weitere, präklinische und klinische Erfahrung wird sich in absehbarer Zeit schrittweise klären lassen, inwieweit sich klinischer Nutzen aus der Xenotransplantation von Zellen, Geweben und Organen gewinnen lässt. Unsere Untersuchungen sollten einen kleinen Beitrag zum besseren Verständnis des xenogenen Systems Schwein/Mensch leisten. Damit könnten vielleicht auf lange Sicht Strategien zur Hemmung von Abstoßungsreaktionen im xenogenen System entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Einwegmaterial

Filterpapier für β -Counter (Whatmann MM)	Schleicher und Duell (Dassel)
Zellkultur-Einweg-Plastikmaterialien	Falcon (Heidelberg), Nunc (Roskilde, Dänemark)
Polypropylen-freie 25 ml Tubes.....	Falcon (Heidelberg)

2.1.2 Verwendete Lösungen und Medien

2.1.2.1 Kommerzielle Lösungen und Medien

Agarose	Sigma (Taufkirchen)
Annexin V FITC Kit.....	Immunotech/Coulter (Marseille)
APO2.7-PE	Immunotech/Coulter (Marseille)
BAM H I	Boehringer Mannheim
BES-Puffer	Roth (Karlsruhe)
BSA (Bovine Serum Albumine)	Boehringer Mannheim
Calciumchlorid.....	Merck (Darmstadt)
Collagenase	Sigma (Taufkirchen)
Digitonin	Sigma (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat.....	Roth (Karlsruhe)
DOTAP	Boehringer Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).....	Gibco (Eggenstein)
Endothelial Cell Growth Factor (ECGF).....	PromoCell (Heidelberg)
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell (Heidelberg)
Ethidiumbromid	Sigma (Taufkirchen)
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco (Eggenstein)
Glukose	Gibco (Eggenstein)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Heparin-Na	Braun/Ratiopharm

HEPES Puffer	Gibco (Eggenstein)
LB Agar	Gibco (Eggenstein)
LB Medium.....	Gibco (Eggenstein)
Lipofectamine Plus Reagent	Gibco (Eggenstein)
Lipofectamine Reagent.....	Gibco (Eggenstein)
Lipofectamine2000 Reagent	Gibco (Eggenstein)
Lipofectin Reagent	Gibco (Eggenstein)
M199/Earle's.....	Gibco (Eggenstein)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor (KB 8301)	Pharmingen (San Diego)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat.....	Roth (Karlsruhe)
OptiMEM.....	Gibco (Eggenstein)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Penicillin	Gibco (Eggenstein)
Phosphatpuffer (PBS).....	Gibco (Eggenstein)
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma (Taufkirchen)
QIAGEN Plasmid Nfidi Kit.....	Qiagen (Hilden)
RPMI 1640-Medium	Gibco (Eggenstein)
Streptomycin	Gibco (Eggenstein)
Trypanblau	Sigma (Taufkirchen)
Trypsin	Gibco (Eggenstein)
Trypsin/EDTA Lösung	Gibco (Eggenstein)
z-VAD-FMK (Universal Caspase Inhibitor)	Biomol (Hamburg)

2.1.2.2 Selbsthergestellte Lösungen

Transportpuffer für Schweineaorten: 500 ml PBS+ 3000 IE Heparin-Na

Enzymlösung zur Präparation nativer PEC: 20 mg Collagenase, 20 mg Trypsin auf 20 ml PBS, + 200 µl CaCl₂ –Lösung

FACS Puffer: PBS, 4% hitzeinaktiviertes FCS

Medium A: 54 ml LB Medium, 0,55 ml 20% Glukose, 0,55 ml 1 M Magnesiumsulfat

Medium B: 25 ml LB Medium, 0,6 ml 1 M Magnesiumsulfat, 6g PEG 7500, Rühren bis PEG gelöst ist, dann Zugabe von 18 ml Glycerin, steril filtrieren

Transfektionspuffer BBS (2x), pH 6,95: NaCl 260 mM, BES 50 mM, NaH₂PO₄ 0,75 mM, Na₂HPO₄ 0,75 mM

2.1.3 Radiochemikalien

³H Thymidine 185,0 MBq/ml; 5,0 mCi/ml..... Amersham (Braunschweig)

2.1.4 Geräte

Autoclaven MMM (München)
Bakterienschtüttler ISF-1-V Adolf Kühner (Schweiz)
β-Counter Wallac (Freiburg)
Bunsenbrenner..... Roth (Karlsruhe)
Durchflußzytometer Epics XL Coulter (Hialeah, USA)
Harvester 96 Wallac (Freiburg)
Konfokales Lasermikroskop Leica (Wetzlar)
Lichtmikroskop IM35..... Zeiss (Jena)
Magnetrührer..... Ikamag Reo, Bachhofer (Reutlingen)
pH-Meter Modell 761 Knick (Berlin)
Photometer Spektrophotometer DU 640 Beckmann (München)
Pipetten Gilson (Middleton, USA)
Sterilbank BDK (Sonnenbühl)
Tischschüttler 3020 GFL (Burgwedel)
Waagen Sartorius (Göttingen)
Wasserbäder 1086 GFL (Burgwedel)
Zentrifugen..... Sorvall RC-5C plus, DuPont (Bad Homburg); J6-MC und L8-80M, Beckmann (München); 5417 und 5417R, Eppendorf (Hamburg)

2.1.5 Antikörper, Markierungen, Fusionsproteine und Isotypen

2.1.5.1 Antikörper

Spezifität	AK	Ziel-Spezies	Isotyp	Konjugat	Hersteller
FasL	NOK 1	Mensch	IgG ₁	FITC	PharMingen
FasL	NOK 1	Mensch	IgG ₁	Biotin	PharMingen
FasL	NOK 2	Mensch	mIgG _{2a}	-	PharMingen
FasL	H11	Maus	ratIg _{2a}	FITC	Alexis
FasL	H11	Maus	ratIg _{2a}	Biotin	Alexis
Fas	antiCD95	Mensch	IgG _{2a}	PE	Pharmingen
Fas	CH11	Mensch	mIgM	-	Immunotech/Coulter
Fas	ZB4	Maus	IgG ₁	-	Immunotech/Coulter
CD3	antiCD3	Mensch	IgG ₁	PE Cy 5	Immunotech/Coulter

2.1.5.2 Fusionsproteine

Fusionsprotein	Isotyp	Konjugat	Hersteller
huCTLA-4/mIgG _{2a} -Fc	mIgG _{2a}	-	Alexis
huCD95/huIgG ₁ -Fc	huIgG ₁	Biotin	Ancell

2.1.5.3 Markierung

Konjugat	Fluorochrom	Hersteller
Streptavidin	PE	Pharmingen
F(ab)	PE	Pharmingen

2.1.5.4 Apoptosemarker

Apoptosemarker	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
Annexin	-	FITC	Immunotech/Coulter
APO2.7	mIgG ₁	PE	Immunotech/Coulter

2.1.6 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Bezugsquelle	Medium
293	Embryonale menschliche Nierenzellen	ATCC	DMEM Medium, 5%Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 10% hitzeinaktiviertes FCS
COS	Affennierenzellen	ATCC	DMEM Medium, 5%Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 10% hitzeinaktiviertes FCS
HAEC 2708	Human Aortic Endothelial Cells (Humane aortale Endothelzellen)	BioWhittaker/Clonetics (San Diego)	Endothelial Cell Growth Medium
HeLa	humane Zelllinie mit epithelartiger Morphologie aus einem Cervix-Karzinom	ATCC	DMEM Medium, 5%Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 10% hitzeinaktiviertes FCS
Jurkat	humane T-Zell-Linie aus Patienten mit akuter Leukämie	ATCC	RPMI Medium, 5%Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 10% hitzeinaktiviertes FCS
PEC	Porcine aortale Endothelzellen	Selbstpräparation	M199/Earle's Medium, 2%Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 20%hitzeinaktiviertes FCS, 1% ECGF
PEC-A	Immortalisierte Porcine Aortale Endothelzellen	ATCC	DMEM Medium, 5%Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 15% hitzeinaktiviertes FCS

2.1.7 Bakterien

XL1 Blue; Invitrogen (Karlsruhe)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank und mit sterilen Materialien durchgeführt. Es wurde grundsätzlich mit auf 37°C angewärmten Lösungen gearbeitet. Die Inkubation und Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO₂, 96% relative Luftfeuchtigkeit). Die Zellen wurden bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Abweichungen von diesen Bedingungen sind gesondert aufgeführt.

2.2.1.1 Präparation nativer PEC

Frische Schweineaorten (mit einer Mindestlänge von 15-20 cm Länge) wurden aus dem Schlachthof München geholt und auf Eis in Transportpuffer aufbewahrt. Auf der Sterilbank wurden die Aorten mit Schere und Pinzette von Fett freipräpariert und entlang der austretenden Gefäße aufgeschnitten. Die aufgeschnittenen Aorten wurden in Spannrahmen eingelegt (Lumenseite nach oben) und mit Phosphatpuffer gespült. Nach Entfernung des Phosphatpuffers wurde das Lumen mit 8 ml Enzymlösung 8 bis 10 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Enzymlösung entfernt, die Endothelschicht zweimalig mit je 5 ml Medium gespült und abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 1000x g und RT zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 20 ml Medium resuspendiert, in eine 150 cm² Zellkulturflasche überführt und inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium erstmals ersetzt, dann alle 48 h. Sobald der Zellmonolayer konfluent war, wurden die Zellen 1:3 gesplittet (nach etwa 3 Tagen). Die Zellen wurden jeden Tag unter dem Mikroskop begutachtet und bei mikrobieller Kontamination oder Auftreten von Muskelzellen verworfen.

2.2.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer initialen Dichte von 0,2 bis maximal 1,0 x 10⁶ Zellen/ml in entsprechendem Medium kultiviert. Zum Umsetzen wurden sie in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml PBS aufgenommen und erneut bei 1000x g für 10 min

zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium überführt, ausgezählt und in gewünschter Menge auf neue Zellkulturflaschen/-schalen aufgeteilt.

2.2.1.3 Kultivierung adhärenter Zellen

Adhärente Zellen wurden als Monolayer in entsprechendem Medium kultiviert. Zur Umsetzung wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung etwa 5 min inkubiert. Die Trypsinierung der Zellen wurde durch Zugabe von 1 ml hitzeinaktiviertem FCS gestoppt, die Zellen durch vorsichtiges Hin- und Her-Pipettieren vereinzelt, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml PBS aufgenommen und erneut bei 1000x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium überführt, ausgezählt und in gewünschter Menge auf neue Zellkulturflaschen/-schalen aufgeteilt.

2.2.1.4 Anlegen von Dauerkulturen

Zur langfristigen Lagerung von Zellen wurden Dauerkulturen angelegt. Zunächst wurden die Zellen hierzu 5 min bei 900x g abzentrifugiert, 1×10^6 Zellen in 1 ml 90% FCS/10% DMSO (RT) resuspendiert und in 2 ml Gefriergefäße überführt. Anschließend wurde die Suspension 1 h auf Eis inkubiert und dann bei -80°C eingefroren. Die längerfristige Lagerung der Dauerkulturen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.1.5 Trypanblau-Färbung und Auszählen von Zellen

Die Neubauer Zählkammer wurde mit einer Mischung von 1 ml Zellsuspension und 100 μl Trypanblau (0,5%) beschickt. Nun wurden die ungefärbten und gefärbten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt (4 große Quadrate mit je 16 Unterteilungen; es wurden nur Zellen gezählt, die auf der oberen und linken bzw. unteren und rechten Linie lagen).

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{gezählte Quadrate}} \times 10000 \text{ ml}$$

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungef. + gefärbte Zellen}} \times 100$$

2.2.1.6 Abschaben von adhärennten Zellen

Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gespült. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Zellkulturflasche/-schale gelöst, in PBS aufgenommen und durch Hin- und Her-Pipettieren mechanisch vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000x g für 10 min abzentrifugiert.

2.2.1.7 Coinkubation von Jurkat-Zellen mit PEC und PEC-A

PEC oder PEC-A wurden in gewünschter Zahl in Kulturschalen aufgeteilt und in entsprechendem Medium inkubiert (je nach Versuch in einer 6 oder 96 „Well Plate“). Sie wurden initial so ausgezählt, dass sich nach 24 h ein konfluenten Monolayer zeigte. Dann wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die gewünschte Zahl an Jurkat-Zellen in Jurkat-Zellkultur-Medium hinzugegeben. Das Effektor/Target Verhältnis (E/T Verhältnis) für die durchflußzytometrische Apoptosemessung mit APO2.7-PE und mit Annexin-FITC betrug von 4:1, 3:1 oder 2:1 (PEC oder PEC-A= Effektor, Jurkat-Zellen= Target). Das Effektor/Target Verhältnis für die Apoptosemessung im JAM-Test betrug 16:1, 8:1, 4:1 oder 2:1. Die Platten wurden bei 200x g zentrifugiert um den Kontakt der Endothelzellen mit den suspendierten Jurkat-Zellen zu gewährleisten. Schließlich wurden die Platten 12h, 18 h, 24 h, 36 h oder 48 h inkubiert. Für den JAM-Test wurden die Platten an diesem Punkt maschinell geerntet und im β -Counter analysiert. Für die FACS-Analyse wurden alle Zellen eines „Wells“ durch Abschaben und Hin- und Her-Pipettieren oder durch Trypsinieren vereinzelt, vollständig in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000x g 10 min zentrifugiert. Schließlich wurde das Zellsediment in FACS Puffer resuspendiert und in FACS Röhrchen überführt. Im Anschluss daran wurden die Zellen für die Analyse im FACS vorbereitet.

2.2.1.8 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen vor FACS

Die Zellen wurden mit 4%igem Paraformaldehyd und 100%igem Methanol fixiert und permeabilisiert. Dabei wurden die Zellen zunächst mit FACS Puffer 2 x gewaschen und dann mit 1 ml 4 %igem Paraformaldehyd 15 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden sie erneut 1 x mit FACS Puffer gewaschen, dann mit 1 ml eiskaltem 100%igen Methanol versetzt und 1 h im Kühlschrank auf Eis belassen. Danach erfolgte nochmals ein zweimaliges Waschen mit FACS Puffer [120].

2.2.2 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

2.2.2.1 Prinzip der Durchflußzytometrie

Das Prinzip der Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS) ist die Analyse der Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel mittels eines optischen Meßsystems. Voraussetzung bei der Analyse von Zellen ist, dass sie als Suspension von Einzelzellen vorliegen. Die Zellsuspension wird angesaugt und im Flüssigkeitssystem des Zytometers in eine Kapillare geleitet, die in der Messkammer (einer von Trägerflüssigkeit laminar durchströmten Quarzküvette) endet. Der Zellstrom wird beim Verlassen der Kapillare von der Trägerflüssigkeit erfasst, auf das Küvettenzentrum verengt und stark beschleunigt, sodass die Zellen einzeln in ausreichendem Abstand zueinander am Messpunkt vorbeifließen ("hydrodynamische Fokussierung"). Am Messpunkt trifft der fokussierte Laserstrahl auf die einzelnen Zellen. Das dadurch entstehende Vorwärtstreulicht (0° - 10° zur Richtung des einfallenden Lichtstrahls) und Seitwärtstreulicht (90° zur Richtung des einfallenden Strahls), sowie die Lichtemission der durch den Laser angeregten Fluoreszenzfarbstoffe werden von Photodetektoren registriert und in elektrische Signale (Einheit Volt) umgewandelt. Jeder gemessenen Signalintensität wird mittels eines Analogdigitalwandlers eine Klassenzahl, die Werte von 0 bis 1024 annehmen kann, zugewiesen. Die Fluoreszenzsignale werden logarithmisch verstärkt und auf einer vier Dekaden (1 bis 1000) umfassenden logarithmischen Skala dargestellt. In Einparameterhistogrammen kann die Häufigkeitsverteilung eines Parameters innerhalb einer Zellpopulation dargestellt werden. Das in dieser Arbeit eingesetzte Durchflußzytometer (Coulter Epics XL-MCL, Hialeah, Florida, USA) ist mit einem luftgekühlten Argon-Ionen-Laser ausgestattet, der monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm mit einer Leistung von 15 mW emittiert. Das an den Zellen entstehende Vorwärtstreulicht (forward scatter, FSC) gibt Aufschluss über die Zellgröße, das Seitwärtstreulicht (sideward scatter, SSC) liefert Informationen über die Membranstruktur und die Granularität der Zellen.

Die zu messenden Zellen wurden nach einem standardisierten Protokoll markiert. Zellen wurden mit Antikörper (AK) für 15 min bei RT oder für 30 min bei 4°C inkubiert. War der erste AK nicht mit einem Farbstoff markiert, so schloss sich nach 1 x Waschen mit FACS Puffer ein zweiter Zyklus mit dem markierten AK an. Es wurden AK verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Phycoerythrin Cy 5 (PE Cy5) konjugiert waren. Jede Messung bezog sich auf eine Isotypkontrolle, die jeweils am selben Tag mit den gleichen Zellen und mit einem definiert

nicht spezifisch bindenden AK des gleichen Isotyps durchgeführt wurde. Während und nach der Färbung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden die Zellsuspension bis zur Messung im Durchflußzytometer bei Dunkelheit gelagert.

2.2.3 Nachweis von FasL

Die Markierung von FasL auf der Zelloberfläche erfolgte durch die Inkubation der eingesetzten Zellen mit huCD95/huIgG₁-Fc-Biotin (zugehöriger Isotyp: huIgG₁-Biotin) oder H11-Biotin (zugehöriger Isotyp: ratIgG_{2a}-Biotin), je 1µg in 50 µl FACS Puffer, 30 min auf Eis. Zum Nachweis von FasL nach vorausgegangener Fixierung/Permeabilisierung wurden dabei 2µg H11-Biotin (zugehöriger Isotyp: ratIgG_{2a}-Biotin) in 50 µl FACS Puffer eingesetzt. Dann wurden die Zellen 1 x mit FACS Puffer gewaschen und anschließend mit Streptavidin-PE (10µg/ml in 100µl FACS-Puffer) 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut einmalig mit FACS Puffer gewaschen und dann für die Messung in FACS Puffer resuspendiert.

2.2.4 Einsatz von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren

Initial wurden 1 x 10⁵ native PEC, PEC-A oder transfizierte PEC-A je „Well“ in einer 6 „Well plate“ in entsprechendem Medium ausplattiert. Nach 24 h hatte sich ein konfluenter Monolayer gebildet. Nun wurde der Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor KB 8301 (MMPI) in einer Konzentration von 1µg/ml Medium zugegeben. Nach einer 24-stündigen Inkubation erfolgte die FACS Analyse. Alternativ wurde der MMPI (1µg/ml Medium) über 72 h mit täglichem Wechsel von Medium und MMPI eingesetzt.

2.2.5 Nachweis von B7

Die Zellen wurden initial einmal mit FACS Puffer gewaschen. Zum Nachweis von B7 auf der Zelloberfläche wurden die Zellen mit 1 µg hCTLA-4/mIgG_{2a}-Fc (zugehöriger Isotyp: mIgG_{2a}) in 50 µl FACS Puffer für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Danach erfolgte nach erneutem einmaligen Waschen mit FACS Puffer die Färbung mit F(ab)-PE (10 µg/ml) in 100 µl FACS Puffer für 30 min im Kühlschrank. Im Anschluss wurden die Zellen erneut einmalig mit FACS Puffer gewaschen und für die Messung in FACS Puffer resuspendiert.

2.2.6 Blockade des B7/CD28-Signalwegs mit CTLA4-IgG

PEC oder PEC-A wurden in 6 „Well Plates“ mit Jurkat-Zellen koinkubiert (siehe oben). Bei der Zugabe der Jurkat-Zellen wurde gleichzeitig 10µg/ml huCTLA-4/mIgG_{2a}-Fc in 2 ml

Jurkat-Zell-Medium hinzugegeben. Nach 24 h Stunden wurden die Zellen mit Annexin-FITC und CD3-PE in angegebener Weise behandelt. Im Anschluss erfolgte die FACS Analyse.

2.2.7 Apoptose-Assays

2.2.7.1 Einsatz der antiFas-AK CH11 und ZB4

CH11 (Fas aktivierender AK) wurde sowohl im JAM-Test als auch in durchflußzytometrischen Versuchen in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. ZB4 (Fas blockierender AK) wurde im JAM-Test in einer Konzentration von 0,5 µg/ml verwendet.

2.2.7.2 Annexin-Assay

PEC und PEC-A wurden mit Jurkat-Zellen in einem E/T-Verhältnis von 4:1, 3:1 oder 2:1 12h, 18 h, 24 h, 36 h oder 48 h koinkubiert. Dann wurden die Zellen für die FACS Analyse in oben aufgeführter Weise vorbereitet. Nun erfolgte zunächst die Färbung mit dem Linienmarker für T-Zellen CD3-PE Cy 5 (5µl in 50 µl FACS-Puffer) für 15 min bei RT. Die Zellsuspension wurde 1 x mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 5 µl Annexin-FITC-Lösung und 490 µl Binding Buffer (im Annexin-FITC-Kit enthalten) mindestens 10 min bei 4°C inkubiert. Daraufhin erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit FACS-Puffer. Danach wurden die Zellen im Durchflußzytometer analysiert. Als Kontrolle diente der Leerwert von nicht mit Annexin, sondern lediglich mit einer äquivalenten Menge an FACS-Puffer versetzten Zellen. Die Auswertung erfolgte als Zwei-Farben-Messung im Durchflußzytometer.

2.2.7.3 APO2.7-Assay

PEC und PEC-A wurden mit Jurkat-Zellen in einem E/T-Verhältnis von 4:1, 3:1 oder 2:1 24 h oder 48 h koinkubiert. Dann wurden die Zellen für die FACS Analyse in oben aufgeführter Weise vorbereitet. Die Zellen wurden 6 min bei 200x g und RT zentrifugiert. Nun erfolgte zunächst die Färbung mit dem Linienmarker für T-Zellen CD3-PE Cy 5 (5µl in 50 µl FACS-Puffer) für 15 min bei RT. Die Zellsuspension wurde 1 x mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 150 µl 4%igem Paraformaldehyd und 850 µl 4°C kaltem PBS fixiert. Die Zellen wurden 1 x mit FACS Puffer gewaschen. Nun erfolgte die Permeabilisation der Zellen durch die Zugabe von 4 µl 4°C kaltem Digitonin (Konz. 25 mg/ml) und 1 ml 4°C kaltem PBS 20 min bei 4°C. Die auf diese Weise durchgeführte Permeabilisierung der Zellen wurde der Gebrauchsanweisung von APO2.7-PE entnommen. Danach wurden die Zellen durch die Zugabe von 20 µl APO2.7-PE (zugehöriger Isotyp: mIgG1 -PE) und 80 µl FACS-Puffer bei

RT markiert und gefärbt. Nach 15 min wurden 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben und die Zellsuspension 6 min bei 200x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und bei 4°C bis zur Messung im Durchflußzytometer aufbewahrt. Zum Vergleich diente die Isotypkontrolle mit mIgG1-PE. Die Auswertung der zwei Farben-Messung erfolgte im Durchflußzytometer.

2.2.7.4 JAM-Test (radiometrischer DNA-Fragmentierungs-Assay)

Jurkat-Zellen (5×10^4 Zellen/ml) wurden für 18 h mit ^3H -Thymidin (5,0 mCi/ml Medium) markiert. PEC und PEC-A wurden in einer Zellzahl von 1×10^4 oder 2×10^4 pro „Well“ in einer 96 „Well Plate“ ausplattiert und wuchsen innerhalb von 24 h zu einem konfluenten Monolayer heran. Die markierten Jurkat-Zellen wurden gewaschen, gezählt und in einer Anzahl von $0,25 \times 10^4$, $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 oder 2×10^4 Zellen dem Endothelzellmonolayer zugegeben (nach 24 h hatte sich die ursprünglich ausplattierte Zahl der PEC und PEC-A verdoppelt). Dies entsprach einem initialen E/T Verhältnis von 16:1, 8:1, 4:1 oder 2:1. Als Bezugswert dienten markierte Jurkat-Zellen, die nicht mit Endothelzellen inkubiert wurden. Weitere Kontrollen waren markierte Jurkat-Zellen, die mit dem apoptoseinduzierenden anti-Fas-Antikörper CH11 oder sowohl mit CH11 als auch mit ZB4 (nicht apoptoseinduzierender anti-Fas-AK) inkubiert wurden. Die Inkubationszeit betrug für alle Bedingungen 18 h. Anschließend wurden die Platten geerntet. Die Radioaktivität in den Filterpapieren wurde über einen β -Counter quantifiziert. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass fragmentierte DNA, wie sie im Rahmen von Apoptose auftritt, beim „Harvesten“ durch das Filterpapier gezogen wird und unfragmentierte DNA im Filterpapier zurückgehalten wird. Mit folgender Formel kann der Prozentsatz der spezifischen DNA-Fragmentierung berechnet werden:

$$1 - \frac{\text{„Counts“ in Anwesenheit der EZ}}{\text{„Counts“ in Abwesenheit der EZ}} \times 100\%$$

EZ: Effektorzellen

2.2.8 Plasmidvervielfältigung in *E. coli*

2.2.8.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Das nachfolgend beschriebene Verfahren zur Herstellung kompetenter *E. coli* basiert auf dem

Protokoll von Nishimura *et al.* [121]. Von dem *E. coli*-Stamm XL1 Blue wurde ein Klon in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 4 ml Luria-Bertani (LB)-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) über Nacht in einer Schüttelkultur bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml der Übernachtskultur in einen Erlmeyerkolben mit 50 ml Medium A gegeben und bei 37°C und 200 Upm im Bakterienschüttler inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.5 - 0.6 wurde die Kultur auf 4°C gekühlt und für 10 min bei 4°C und 1500x g abzentrifugiert, die sedimentierten Bakterien in 0,5 ml Medium A resuspendiert und dann mit 2,5 ml Medium B vermischt (durch Schwenken). Abschließend wurde die erhaltene Bakteriensuspension zu je 150 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.8.2 Transformation von *E. coli*

Um eine ausreichende Menge an Plasmid DNA für die Transfektion von PEC-A zu gewinnen wurden die *E. coli* Bakterien mit den gewünschten Plasmiden transformiert. Das Plasmid enthielt in jedem Fall ein Ampicillin Resistenzgen.

100 µl einer kompetenten *E. coli*-Suspension wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA (Konz. DNA: 1µg/µl) vermischt. Die Bakterien wurden anschließend weitere 25 bis 30 min auf Eis und danach 60 sek bei 42°C inkubiert. Dann erfolgte eine erneute Inkubation der Bakterien/Plasmid Suspension für 2 min auf Eis. Der Ansatz wurde mit 1 ml LB-Medium supplementiert und bei 37°C für 55 bis 70 min im Bakterienschüttler inkubiert. 100 µl der Lösung wurden nun zur Selektion auf ampillinhaltigen (100µg/ml) LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank belassen. Damit wurde gewährleistet, dass sich nur die Bakterien vermehrten, die auch das Plasmid integriert hatten. Nach 16 h wurden die Platten weiter bei 4°C gelagert.

2.2.8.3 Herstellung einer Megapräparation Plasmid transfizierter Bakterien

Zunächst wurde ein Bakterienklon der transformierten Bakterien gepickt und in einem 15 ml Reaktionsgefäß in 4 ml LB Medium (+Ampicillin, Konzentration 100 µg/ml) 6 bis 8 h im Bakterienschüttler bei 200 Upm und 37°C inkubiert. Die Suspension würde dann auf zwei große Erlmeyerkolben, welche jeweils 1,25 l LB-Medium (+Ampicillin, Konz. 100 µg/ml) enthielten, verteilt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 200 Upm im Bakterienschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in „GSA Tubes“ (etwa 400 ml Bakteriensuspension pro „Tube“) überführt. Nach Austarieren wurden die „GSA Tubes“ 45 min bei 4°C und 5000 g in einer vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und die „GSA Tubes“ mit dem Bakterienpellet bei -20°C bis zur Plasmidextraktion aufbewahrt.

2.2.8.4 Plasmidextraktion

Die Isolierung von Plasmid-DNA im mg-Maßstab erfolgte nach dem Protokoll und den Materialien des QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Diese Methode basiert auf der alkalischen Lyse [122] und der Adhäsion von DNA an Silikamembranen in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen [123].

2.2.8.5 Plasmidverdau

Der Plasmidverdau wurde mit einer Restriktionsendonuklease durchgeführt. Dazu wurden 1,5 µg DNA, 2 µl Restriktionspuffer und 1 µl BSA zusammengegeben und mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 19 µl aufgefüllt, zuletzt wurde 1 µl der Restriktionsendonuklease BAM H I zugegeben und vermischt. Die Suspension wurde mindestens 1 h in einem Heizblock bei 37°C inkubiert.

2.2.8.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

500 ng der verdauten Plasmid DNA wurden in einem niederschmelzenden 1%igem Agarosegel, das mit 0,04% Ethidiumbromid versetzt war, bei 7,5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch das inkorporierte Ethidiumbromid unter UV-Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$) visualisiert und der entsprechende Gelbereich mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die isolierten Gelfragmente wurden anschließend bei 65°C aufgeschmolzen und die so erhaltene DNA direkt für die Ligation verwendet.

2.2.8.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsmessung von DNA wurde die DNA-Lösung 1:50 in 200 µl H₂O verdünnt und die Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) spektralphotometrisch bestimmt (DNA weist bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum auf. Bei doppelsträngiger DNA wird bei einer OD₂₆₀ = 1,0 eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml zugrunde gelegt).

Formel: $c = OD_{260} \times k / \epsilon \times d$

c = Konzentration in mM/l

k = Verdünnungsfaktor

ϵ = Extinktionskoeffizient in $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

d = Küvettschichtdicke in cm

Wird bei einer Wellenlänge von 280 nm ein weiteres Absorptionsmaximum gemessen, deutet dies auf die Anwesenheit von Proteinen in der Lösung hin. Der Quotient der Absorptionskoeffizienten, die bei 260 nm gemessen wird, gibt Aufschluss über die Reinheit einer DNA-Präparation. Bei reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient bei ungefähr 2. Niedrigere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte hingegen können ein Anzeichen für die Anwesenheit von RNA sein oder zeigen an, dass die DNA denaturiert ist. In unseren Proben lag der Quotient bei etwa 2.

2.2.9 Transiente Transfektion von PEC-A

2.2.9.1 Verwendete Plasmide

pEGFP (Clontech)

hFasL (Dr. med. Robert Endres, Institut für Mikrobiologie, LMU München)

hFasLMut (Klinikum Rechts der Isar, TU München)

2.2.9.2 Liposomale Transfektion

Das liposomale Transfektionsreagenz, die Menge an DNA, die Menge an liposomalem Transfektionsreagenz, das Verhältnis des liposomalen Transfektionsreagenz zur DNA Menge, die Zellkonfluenz, die Transfektionsdauer und das Transfektionsmedium haben unter anderem Einfluss auf die Effizienz der Transfektion. Diese Parameter wurden für die Zelllinie PEC-A optimiert, wobei Herstellerinformationen berücksichtigt wurden. Für den Einsatz von Lipofectin, Lipofectamine und Lipofectamine Plus sollte laut Herstellerangaben die Konfluenz des zu transfizierenden Zellrasens 50-60% betragen. Diese war nach 12 h erreicht, wenn initial 1×10^5 PEC-A Zellen pro „Well“ in einer 6 „Well Plate“ ausplattiert wurden. Für den Einsatz von DOTAP sollte laut Herstellerangaben die Konfluenz des zu transfizierenden Zellrasens 60-80% betragen. Diese war nach 12 h erreicht, wenn initial $1,2 \times 10^5$ PEC-A Zellen pro „Well“ in einer 6 „Well Plate“ ausplattiert wurden. Für die Transfektion mit Lipofectamine2000 sollte laut Herstellerangaben eine Zellkonfluenz von 90-95% bestehen. Diese wurde nach 12 h erreicht wenn initial $1,3 \times 10^5$ PEC-A ausplattiert wurden. Zur Transfektion wurde ein Gemisch aus aufgereinigter Plasmid-DNA in Lipofectin, Lipofectamine, Lipofectamine Plus oder Lipofectamine2000 in OptiMEM oder DOTAP in HEPES Puffer separat angesetzt. Da liposomale Transfektionsreagenzien an bestimmte Kunststoffe adsorbieren, wurden Polypropylen-freie Materialien verwendet. Für die Transfektion mit DOTAP wurde 2,5 µg DNA in 22,5 µl HEPES Puffer gegeben. 15 µl DOTAP wurden mit 35 ml HEPES verdünnt. Für die Transfektion mit Lipofectamine,

Lipofectamine Plus und Lipofectin wurden 1 µg oder 2 µg DNA in 100 µl Opti-MEM Lösung gegeben. Das liposomale Transfektionsreagenz wurde in unterschiedlicher Menge (2, 5, 10, oder 20 µl) in 100 µl Opti-MEM verdünnt. Nur für die Transfektion mit Lipofectamine2000 wurde 1 µg, 2 µg oder 4 µg DNA in 250 µl Opti-MEM gegeben. Für jeden der beschriebenen Ansätze wurden beide Komponenten vorsichtig vermengt. Das Gemisch inkubierte nun 30 bis 45 min bei RT. Schließlich wurde die Transfektionssuspension zu den gewaschenen adhären Zellen gegeben. Zusätzlich wurde 0,8 ml Opti-MEM, 0,8 ml Medium ohne Antibiotikum oder 0,8 ml Medium ohne Serum hinzugegeben (sodass die Plattenoberfläche ausreichend mit Flüssigkeit bedeckt war). Die Zellen wurden für einen definierten Zeitraum (30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 5,5 h, 6 h, 7 h) mit den DNA/Lipid-Komplexen inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionssuspension vorsichtig abgesaugt und durch Medium ersetzt.

Bei der Transfektion von PEC-A in Suspension wurden frisch gewaschene PEC-A (jeweils in Suspension in Opti-MEM oder in PEC-A Kulturmedium in einem „Well“ einer 6 „Well Plate“) mit jeweils 1 µg DNA in 250 µl Lipofectamine2000, in 100 µl Lipofectamine Plus oder in 100 µl Lipofectamine und jeweils der entsprechenden Menge Opti-MEM in einem Volumen von 1 ml inkubiert (Zugabe in oben aufgeführter Weise). Nach 2 h wurde das Transfektionsgemisch abgenommen und durch PEC-A Kulturmedium ersetzt. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt adhären und verblieben in den Platten.

2.2.9.3 Transfektion durch die Kalzium-Phosphat-Methode

Zu 58,5 µl 260 mM CaCl₂ wurde 2,4 µg Plasmid-DNA gegeben. Diese Mischung wurde unter Schütteln sukzessive in 58,5 µl Transfektionspuffer BBS (2x) getropft und für 15 min inkubiert. Die in einem 6 „Well Plate“ ausplattierten PEC-A waren zu 50 bis 60% konfluent. Das Medium wurde abgesaugt und durch 1,5 ml DMEM/10% FCS ersetzt. Dann wurde der Transfektionsansatz unter Schwenken zugegeben und nach 12 h Inkubation im Brutschrank durch frisches DMEM/10% FCS ersetzt. Abschließend wurden die Zellen weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von FasLigand

3.1.1 Nachweis von FasL mit anti-FasL-Antikörpern

Zunächst etablierten wir eine Methode zum Nachweis von FasL. Dazu wurden hFasL-positive Zellen mit verschiedenen anti-FasL-Antikörpern im Durchflußzytometer auf die Expression von FasL getestet. Zum Nachweis von FasL auf adhärennten Zellen wurden diese entweder durch Verwendung von Trypsin oder mechanisch von der Plattenoberfläche gelöst. Da auf allen, mit Trypsin behandelten Zellen grundsätzlich kein FasL nachgewiesen werden konnte, wurde in den weiteren Experimenten auf den Einsatz von Trypsin verzichtet. Ein eindeutiger Nachweis von humanem FasL in der Durchflußzytometrie gelang mit dem Einsatz des Biotin-gekoppelten murinen anti-FasL-AK H11 und anschließender Färbung mit Streptavidin-PE. Die bekannte Expression von FasL auf HeLa-Zellen [86] ließ sich damit problemlos belegen (s. Abbildung 1). Ebenso gelang mit dem Einsatz von H11-Biotin/Streptavidin-PE der Nachweis von FasL auf den Zelllinien COS und 293 (s. Abbildung 2/Abbildung 3).

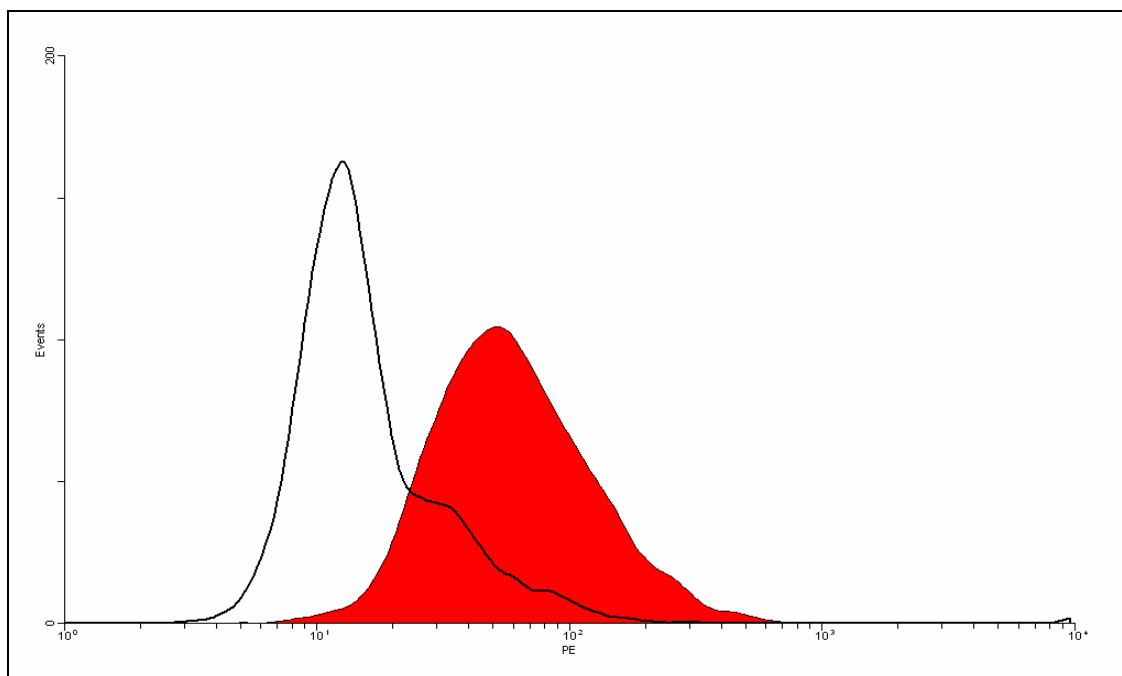


Abbildung 1: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf HeLa-Zellen. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 7 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des murinen monoklonalen anti-FasL-AK H11-Biotin/Streptavidin-PE an HeLa-Zellen. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von ratIgG_{2a}-Biotin/Streptavidin-PE an HeLa-Zellen dar.

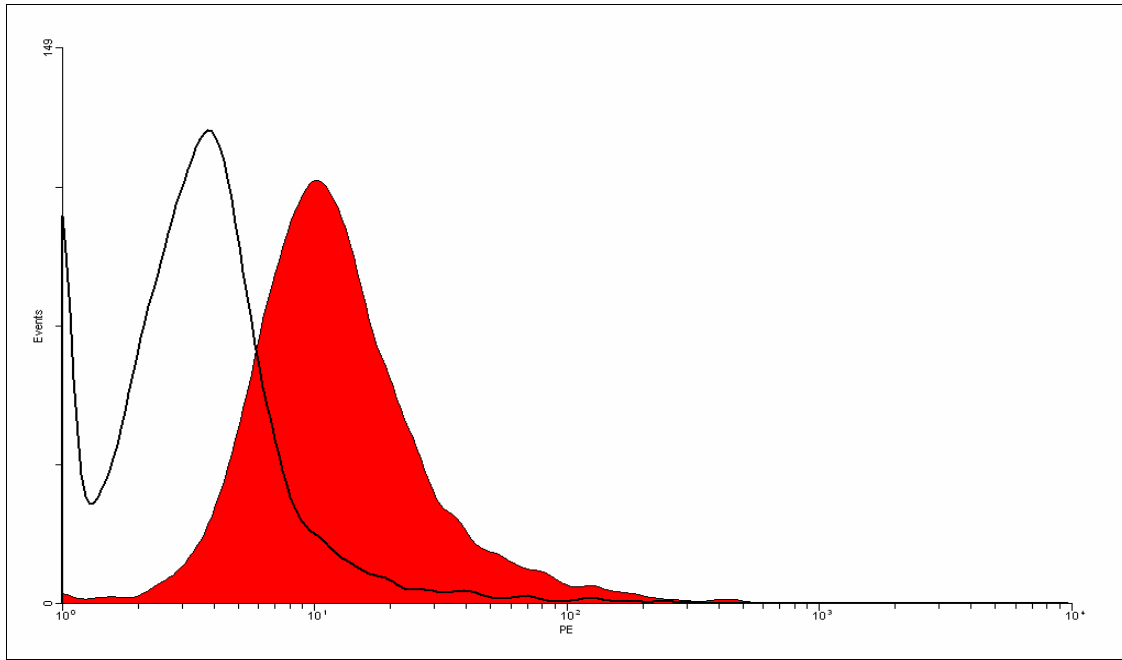


Abbildung 2: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf COS-Zellen. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des murinen monoklonalen anti-FasL-AK H11-Biotin/Streptavidin-PE an COS-Zellen. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von ratIgG_{2a}-Biotin/Streptavidin-PE an COS-Zellen dar.

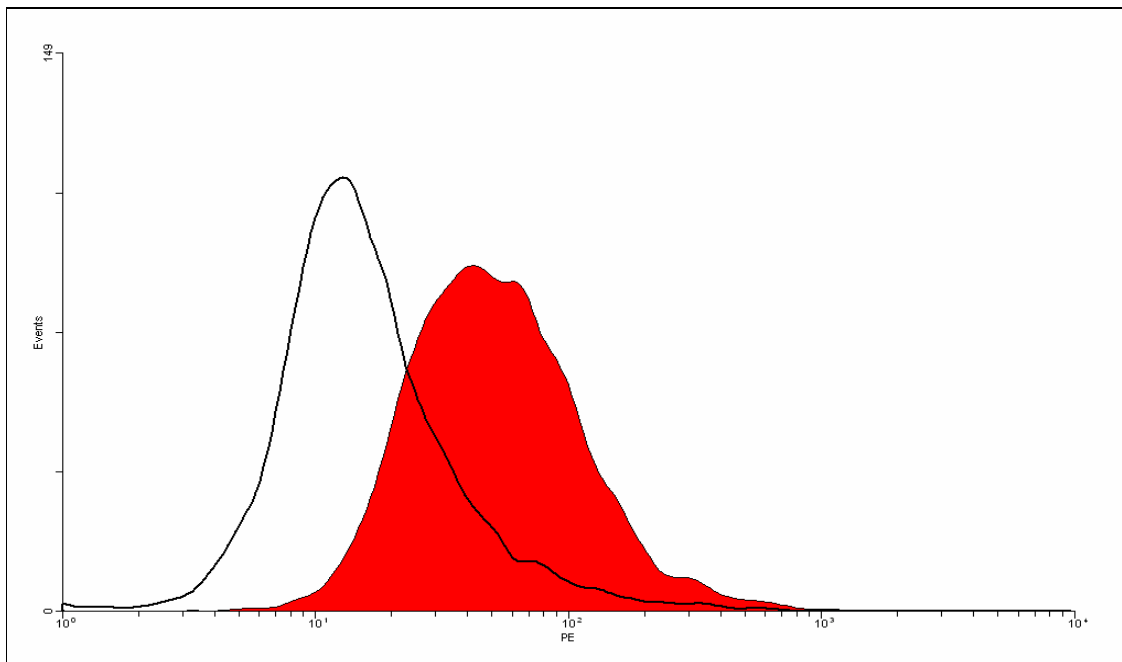


Abbildung 3: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf 293-Zellen. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des murinen monoklonalen anti-FasL-AK H11-Biotin/Streptavidin-PE an 293-Zellen. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von ratIgG_{2a}-Biotin/Streptavidin-PE an 293-Zellen dar.

Sata und Walsh konnten zeigen, dass humane aortale Endothelzellen (HAEC) FasL exprimieren [83]. Ein Nachweis auf porcinen aortalen Endothelzellen (PEC) war zum Zeitpunkt der Durchführung der gezeigten Experimente noch nicht erfolgt. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Vor dem Versuch FasL auf PEC und PEC-A nachzuweisen, wurde zunächst die Expression von FasL auf HAEC mit dem anti-FasL-AK H11 nachvollzogen (s. Abbildung 4).

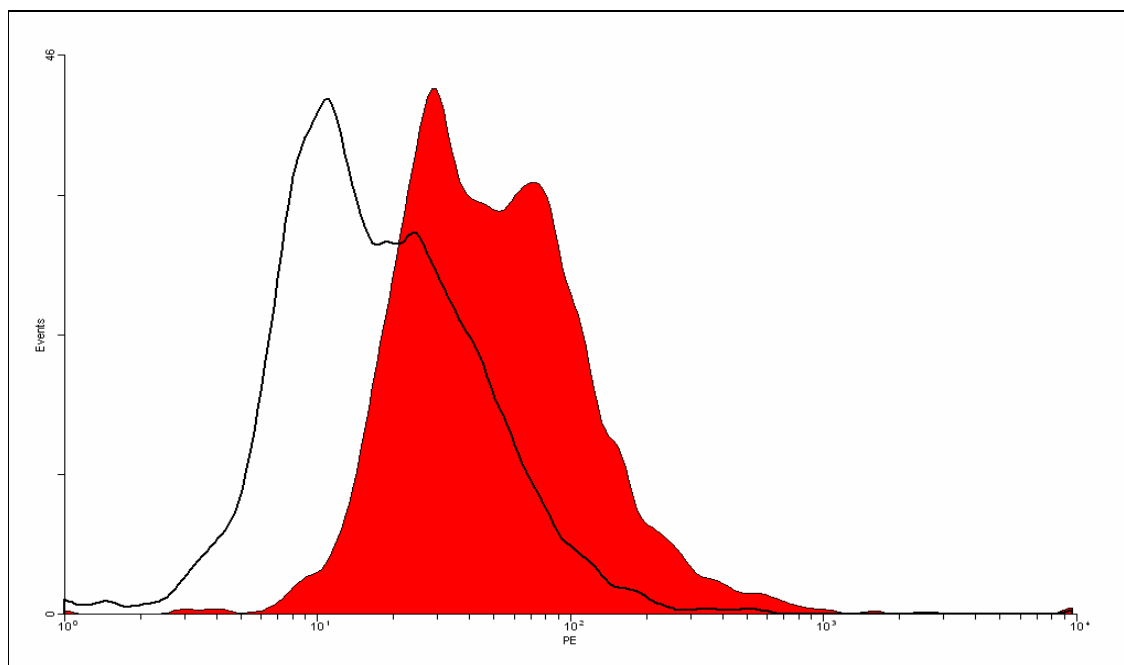


Abbildung 4: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf HAEC. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des murinen monoklonalen anti-FasL-AK H11-Biotin/Streptavidin-PE an HAEC. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von ratIgG_{2a}-Biotin/Streptavidin-PE an HAEC dar.

In Annahme einer Kreuzreaktion des verwendeten murinen anti-FasL-AK H11 mit pFasL, versuchten wir FasL auf PEC und PEC-A zu detektieren. FasL-Expression auf PEC (Daten nicht gezeigt) und PEC-A konnte mit H11-Biotin/Streptavidin-PE durchflußzytometrisch nicht eindeutig nachgewiesen werden (s. Abbildung 5). Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen PEC und PEC-A. Um nicht nur extrazellulären, sondern zusätzlich auch intrazellulären FasL nachzuweisen, wurden PEC und PEC-A fixiert und permeabilisiert. Dadurch ergab sich ein gering positiver Nachweis von FasL auf PEC (Daten nicht gezeigt) und PEC-A (s. Abbildung 6) in der FACS-Analyse mit H11-Biotin/Streptavidin-PE.

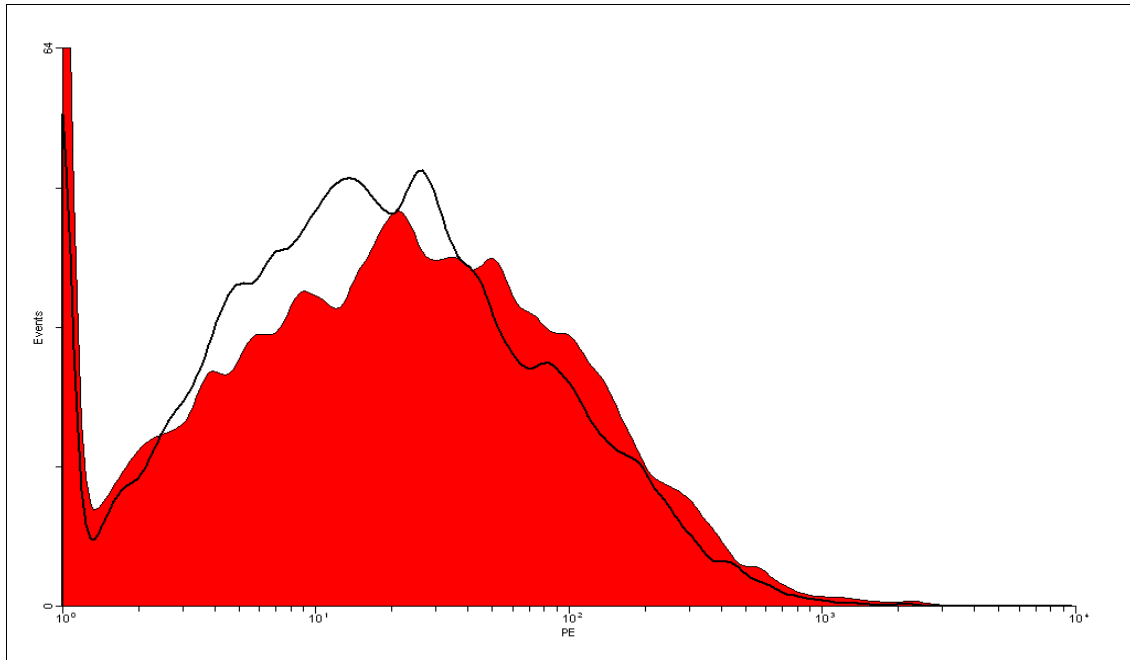


Abbildung 5: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf unbehandelten PEC-A. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des murinen monoklonalen anti-FasL-AK H11-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von ratIgG_{2a}-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A dar.

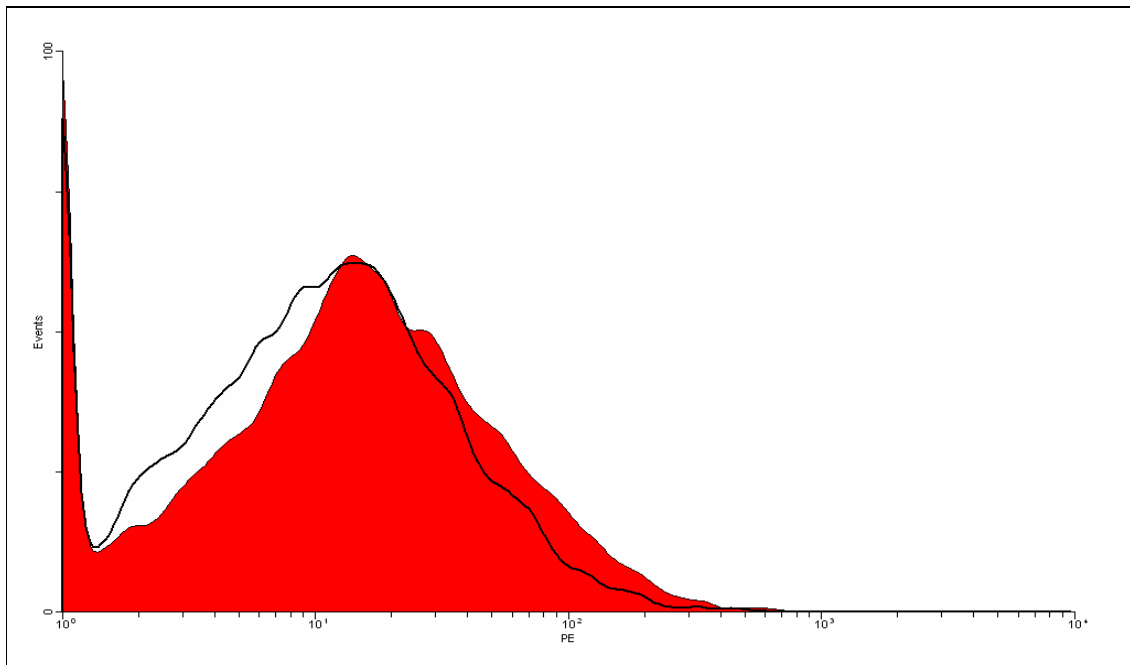


Abbildung 6: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf fixierten/permeabilisierten PEC-A. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des murinen monoklonalen anti-FasL-AK H11-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von ratIgG_{2a}-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A dar.

Die FACS-Messungen mit PEC zeigten die gleichen Ergebnisse wie die FACS-Messungen mit PEC-A. Eine gewisse Kreuzreaktivität des murinen anti-FasL-AK H11 mit pFasL ist damit anzunehmen. Diesem Ergebnis zufolge ist davon auszugehen, dass PEC und PEC-A ebenso wie humane FasL+ Zellen FasL intrazellulär speichern.

3.1.2 Nachweis von FasL mit einem Fusionsprotein

Der Fas-Anteil des Fusionsprotein huCD95huIg-Fc stellt den physiologischen Rezeptor von hFasL dar. Ein Antikörper gegen FasL bindet an ein einzelnes Epitop von FasL. Es ist zu erwarten, dass ein Nachweis von pFasL mit huCD95huIg-Fc eine größere Homologie zwischen pFasL und hFasL implizieren würde, als der Nachweis von pFasL mit einem murinen anti-FasL-AK.

Der durchflußzytometrische Nachweis von hFasL auf HeLa-Zellen und HAEC gelang mit huCD95huIg-Fc, dessen Fc-Anteil mit Biotin markiert war. Die Färbung erfolgte mit Streptavidin-PE (s. Abbildung 7/Abbildung 8). Der Nachweis von hFasL mit einem Fusionsprotein war insgesamt weniger eindeutig als mit dem anti-FasL-AK H11.

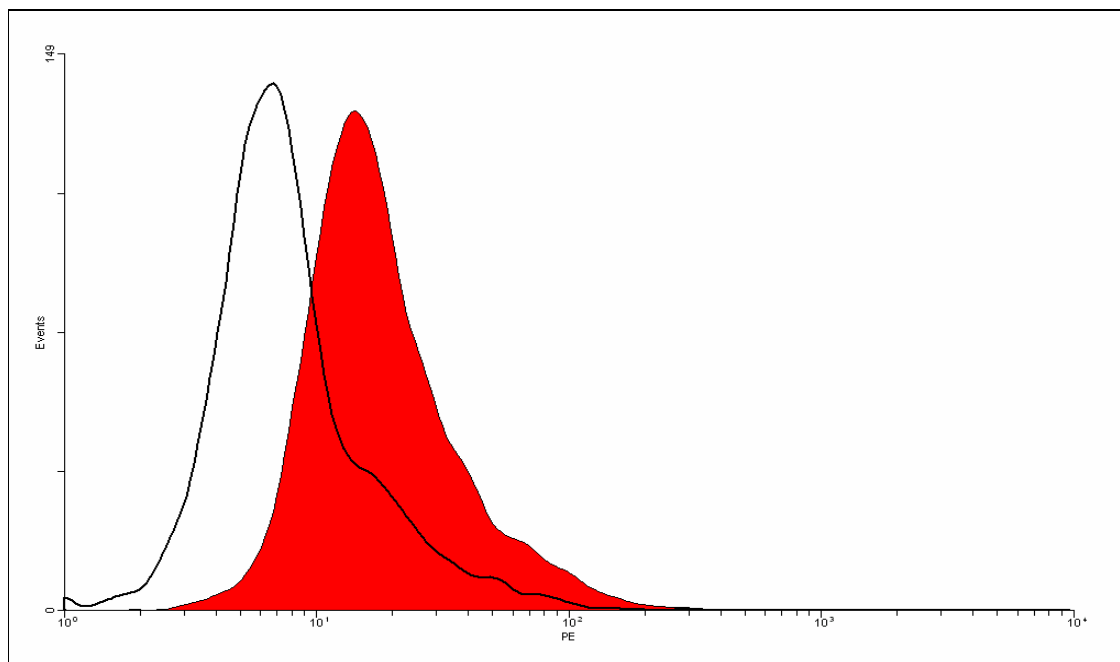


Abbildung 7: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf HeLa-Zellen. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des Fusionsproteins huCD95huIg-Fc-Biotin/Streptavidin-PE an HeLa-Zellen. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von huIgG1-Biotin/Streptavidin-PE an HeLa-Zellen dar.

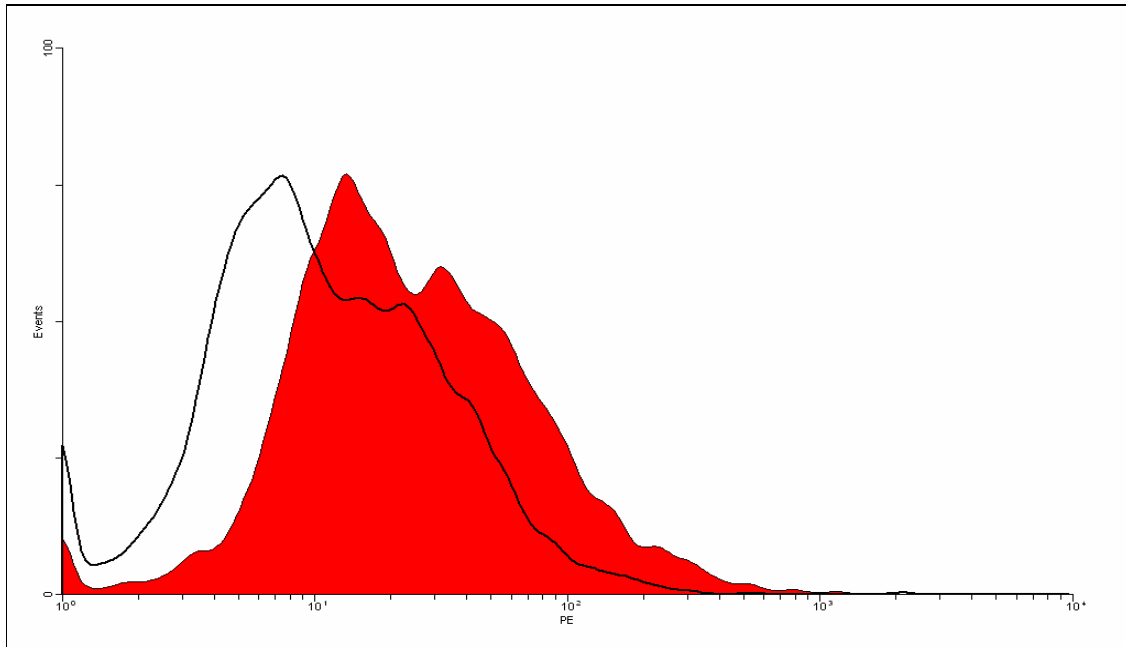


Abbildung 8: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf HAEC. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des Fusionsproteins huCD95huIg-Fc-Biotin/Streptavidin-PE an HAEC. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von huIgG1-Biotin/Streptavidin-PE an HAEC dar.

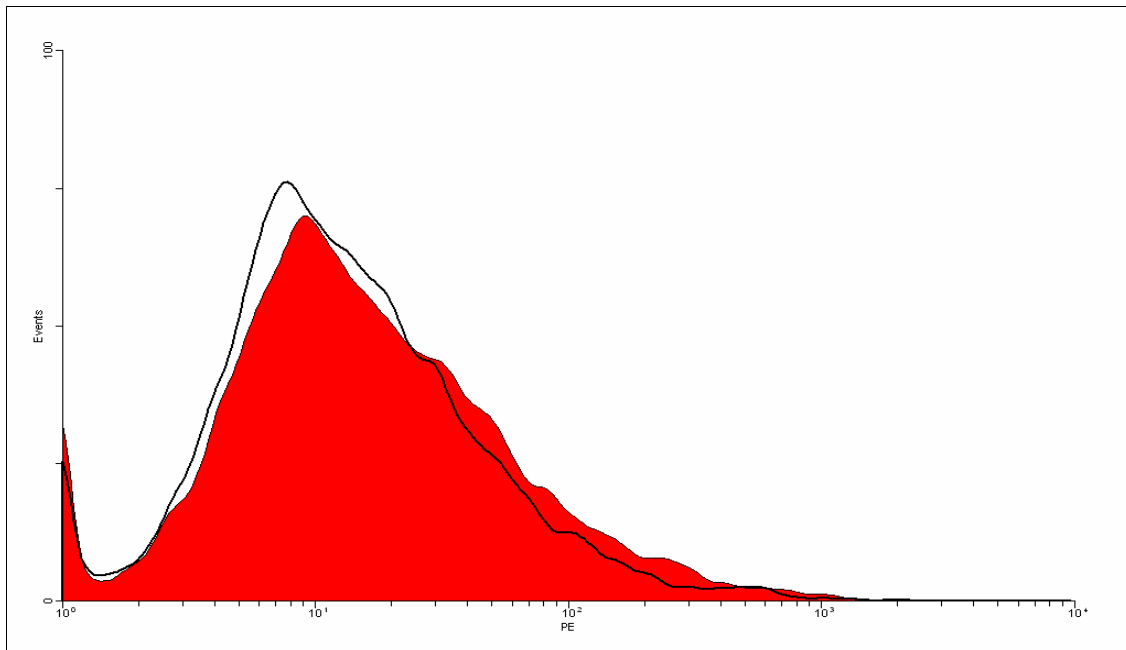


Abbildung 9: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf PEC-A. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des Fusionsproteins huCD95huIg-Fc-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von huIgG1-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A dar.

Die Detektion von FasL auf PEC (Daten nicht gezeigt) und PEC-A mit dem Fusionsprotein huCD95huIg-Fc gelang nicht eindeutig (s. Abbildung 9), analog zu dem Nachweis mit dem anti-FasL-AK H11-Biotin/Streptavidin-PE. Es zeigten sich gleiche Ergebnisse für PEC und PEC-A.

3.1.3 Verhinderung der Abspaltung von FasL

FasL kann durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) von der Zelloberfläche abgespalten werden. Durch Zugabe von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren (MMPI) lässt sich dies verhindern [124]. Eine fehlende Detektion von FasL auf PEC und PEC-A könnte Folge dieser Abspaltung sein. In Abbildung 5 wird die Grundexpression von FasL auf PEC-A Zellen dargestellt. Im Vergleich dazu ergab die FACS-Analyse mit H11-Biotin und Streptavidin-PE nach einer 24-stündigen Inkubation von PEC-A mit MMPI einen gering positiven Nachweis von FasL (s. Abbildung 10). Beim Versuch FasL auf nativen PEC nach Inkubation mit MMPI nachzuweisen, ergaben sich gleiche Resultate wie mit PEC-A (Daten nicht gezeigt). Somit ist davon auszugehen, dass ein Teil des porcinen FasL durch MMP von der Oberfläche der Zellen abgespalten wird und der Nachweis von FasL auf PEC und PEC-A mit dem Einsatz von MMPI erleichtert wird.

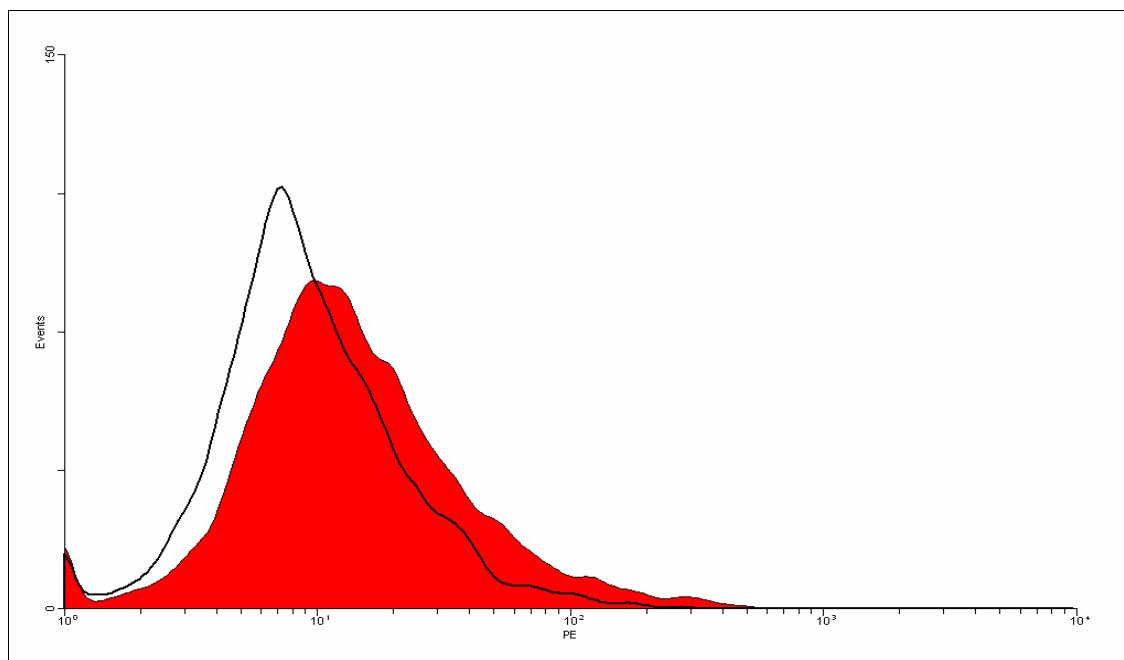


Abbildung 10: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf PEC-A nach einer 24-stündigen Inkubation mit zVAD. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des murinen monoklonalen anti-FasL-AK H11-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von ratIgG_{2a}-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A dar.

3.2 Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen

3.2.1 Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen durch Antikörper im JAM-Test

Ein Ziel unserer Arbeit war die Untersuchung von Apoptose in einer Kokultur von Fas+ humanen Jurkat-Zellen mit PEC und PEC-A. Hierfür war es notwendig ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung von Fas-vermittelter Apoptose in Jurkat-Zellen zu etablieren. Der JAM-Test (JAM: Just Another Method) gilt als gängiger Test zum Nachweis von Apoptose [125]. Er zeigt quantitativ das Ausmaß der DNA-Fragmentierung in radioaktiv markierten Suspensionszellen. Dieser Test erwies sich als gut geeignet für den Nachweis von CH11-induzierter Apoptose in einer Monokultur von mit ^3H -Thymidin radioaktiv markierten Jurkat-Zellen (Suspensionszellen). CH11 ist ein aktivierender Fas-AK und induziert Apoptose in Fas+ Zellen wie Jurkat-Zellen.

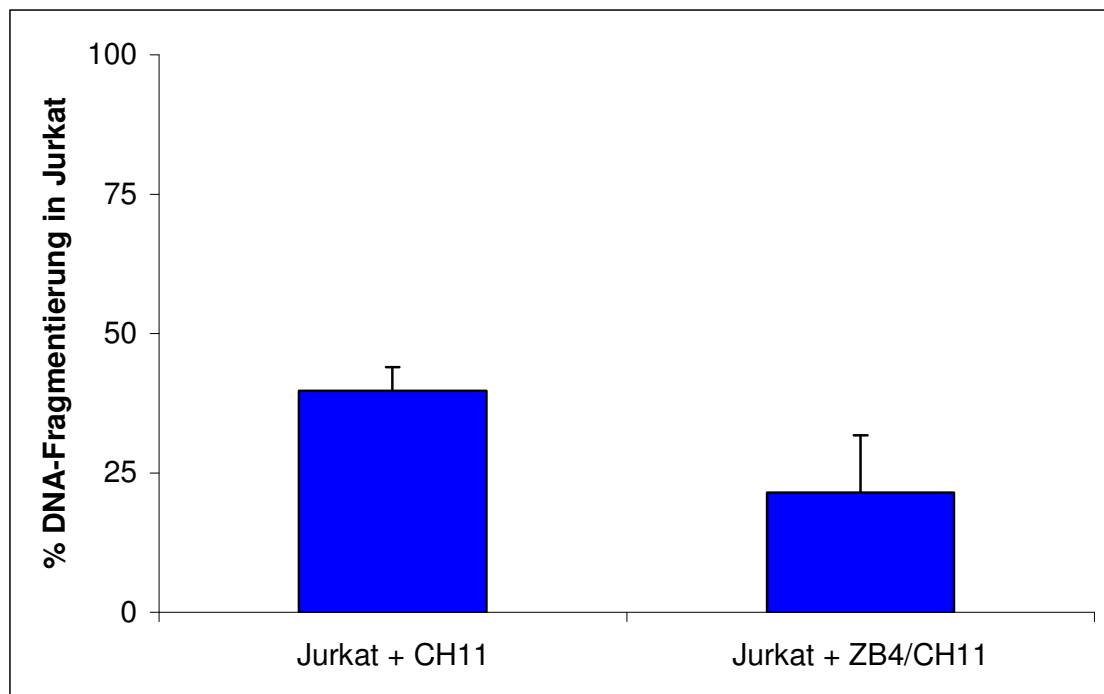


Abbildung 11: DNA-Fragmentierung in Jurkat-Zellen in % \pm SD nach Inkubation mit CH11 und CH11/ZB4 (n = 6)

Abbildung 11 zeigt die DNA-Fragmentierung in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit CH11 (40%) und die spezifische Blockade von CH11 vermittelter Apoptose durch den Einsatz des Fas-blockierenden AK ZB4 (22%).

3.2.2 Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen durch PEC und PEC-A im JAM-Test

Der JAM-Test eignete sich gut zum Nachweis von durch den aktivierenden Fas-AK CH11-vermittelter Apoptose in Jurkat-Zellen. Also gingen wir davon aus, dass eine möglicherweise auftretende Fas/FasL-vermittelte Apoptose in einer Kokultur von PEC oder PEC-A mit Jurkat-Zellen durch diesen Test zu zeigen wäre. In unseren Experimenten dienten Jurkat-Zellen als Zielzellen, PEC oder PEC-A als Effektorzellen.

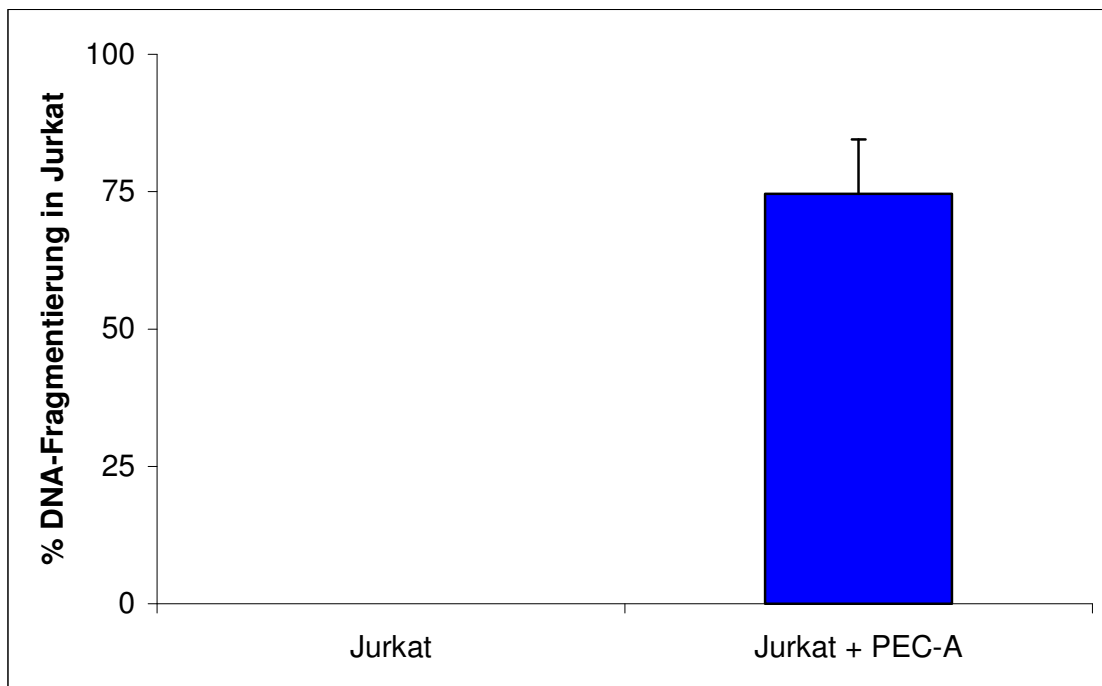


Abbildung 12: Angenommene DNA-Fragmentierung in Jurkat-Zellen in % \pm SD nach Inkubation mit PEC-A (n = 6)

Zunächst deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass PEC und PEC-A Apoptose in humanen Jurkat-Zellen induzieren können (s. Abbildung 12). Platten, in denen sich eine Kokultur von PEC oder PEC-A mit ^3H -Thymidin markierten Jurkat-Zellen befand, ergaben nach Analyse der Platten im β -Counter eine wesentlich geringere Anzahl radioaktiver „Counts“ im Vergleich zur Negativkontrolle (Jurkat-Zellen alleine). Nach Coinkubation von Jurkat-Zellen mit PEC oder PEC-A errechnete sich eine DNA-Fragmentierung von 75%. Dies verleitet zur Annahme, dass es zu massiver DNA-Fragmentierung in Jurkat-Zellen nach Coinkubation mit PEC oder PEC-A kommt. Nach mehreren widersprüchlichen Ergebnissen bei der Inkubation mit spezifischen Fas-AK, FasL-AK und einem Caspase-Inhibitor wurden die Platten nach der maschinellen Ernte mittels Mikroskop untersucht. Dabei wurde ersichtlich, dass sich ein

beträchtlicher Anteil der Zellen noch adhärent in den einzelnen Platten befand. Anschließende Messungen ergaben, dass dadurch ein großer Prozentsatz der Jurkat-Zellen in den Platten zurückgehalten wurden, nicht durch das Filterpapier gespült wurden und damit bei der Messung fehlten. Letztlich zeigte sich nach dieser Analyse kaum mehr DNA-Fragmentierung in Jurkat-Zellen. Es stellte sich heraus, dass genau dieses Phänomen bereits in anderen Studien beobachtet werden konnte und ebenfalls zu einer falschen Interpretation Fas/FasL-vermittelter Apoptoseraten geführt hatte [126]. Wir versuchten nun die in den Platten verbliebenen Zellen durch mehrmaliges „Harvesten“ in die Messung miteinzubringen. Dabei wurden die Zellen bei jedem Schritt auf ein neues Filterpapier oder bis sieben mal hintereinander auf dasselbe Filterpapier gespült (wobei das Filterpapier grundsätzlich millimetergenau gleich in den β -Counter platziert werden musste, um die eindeutige Zuordnung der „Counts“ zu den einzelnen Platten zu gewährleisten). Bei der Verwendung mehrerer Filterpapiere wurden die Filterpapiere nacheinander im „ β -Counter“ analysiert und die „Counts“ addiert. Nach mehrmaligem „Harvesten“ (bis zu sieben mal) und Änderung des „Harvest“-Programms konnten immer noch radioaktive „Counts“ auf einem folgenden frisch eingelegten Filterpapier nachgewiesen werden. Weiteres „Harvesten“ schien uns in Anbetracht der zu erwartenden Verfälschung der Ergebnisse nach sieben Ernteschritten nicht mehr sinnvoll. Wir zogen den Schluss, dass der JAM-Test zur Messung von Apoptose in unserer Versuchsanordnung nicht geeignet war, da mit stark adhärenenten Zellen (PEC-A, PEC) gearbeitet wurde.

3.2.3 Durchflußzytometrische Apoptosemessungen mit Annexin

Da sich der JAM-Test als mögliches Nachweisverfahren für Apoptose in einer Kokultur von PEC oder PEC-A mit humanen Jurkat-Zellen für unsere Versuche als ungeeignet herausstellte, suchten wir nach einer anderen Methode zur Apoptosemessung. Der durchflußzytometrische Nachweis von Phosphatidylserin mit Annexin bot hierfür eine Möglichkeit. Phosphatidylserin wird in einer frühen Apoptosephase von der Membraninnenseite an die Membranaußenseite der Zelle gekehrt. Annexin bindet spezifisch an Phosphatidylserin [127].

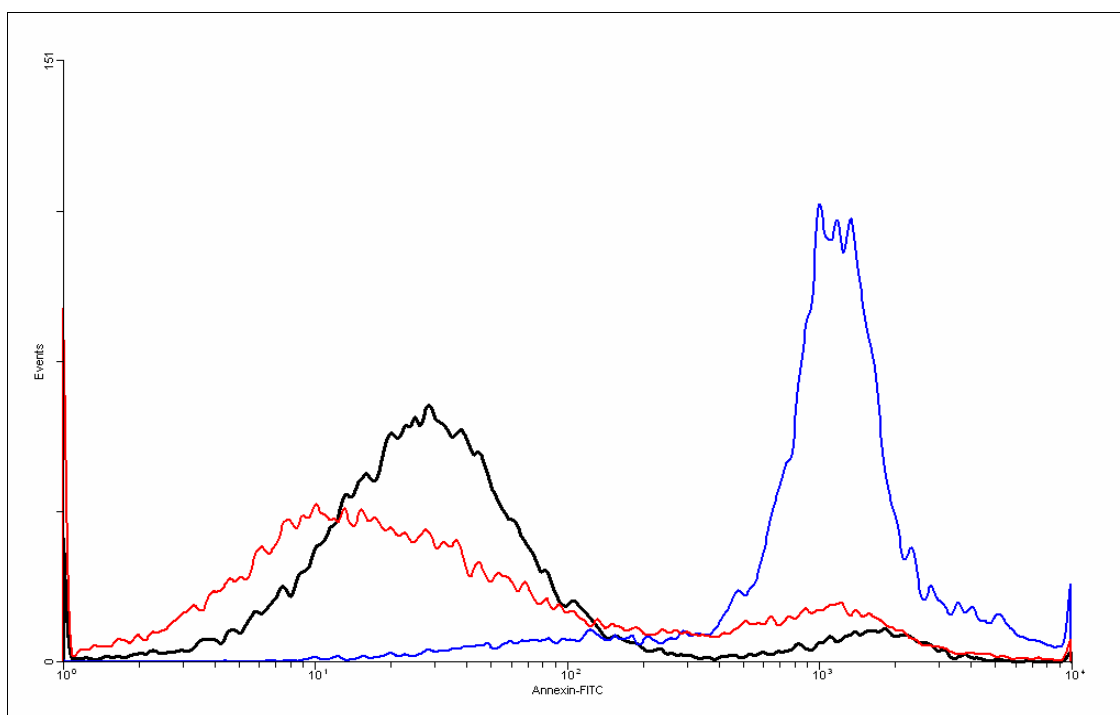


Abbildung 13: Durchflußzytometrischer Nachweis von Apoptose mit Annexin-FITC. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von je 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit einem initialen E/T Verhältnis von 4:1/ 3:1 oder 2:1 und nach einer Inkubationszeit von 12, 18, 24 oder 48 h. Die blaue Kurve bildet die spezifische Bindung von Annexin-FITC an mit dem aktivierenden anti-Fas-AK CH11 inkubierte Jurkat-Zellen ab. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung von Annexin-FITC in der Kokultur Jurkat-Zellen+PEC-A. Die schwarze Kurve stellt die spezifische Bindung von Annexin-FITC an Jurkat-Zellen (Monokultur) dar.

In unseren FACS-Messungen mit Annexin-FITC konnte CH11-induzierte Apoptose in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden. Sie zeigten keine vermehrte Apoptose in der Kokultur von Jurkat-Zellen+PEC (Daten nicht gezeigt) und Jurkat-Zellen+PEC-A (s. Abbildung 13) im Vergleich zur Jurkat-Zellen Monokultur. Dabei wurde ein 100% konfluenter Monolayer PEC oder PEC-A 12, 18, 24 oder 48 Stunden mit Jurkat-Zellen in einem initialen Effektor/Target Verhältnis von 4:1, 3:1 oder 2:1 inkubiert. Trotz der Variation der Inkubationsdauer und des

E/T Verhältnisses lies sich keine Apoptose in Jurkat-Zellen detektieren. Die rote Kurve (Jurkat-Zellen+PEC-A) und schwarze Kurve (Jurkat-Zellen Monokultur) in Abbildung 13 überlagern sich nicht vollständig. Bei der geringfügigen Abweichung der beiden Kurven zueinander, insbesondere im Vergleich zur blauen Kurve (Jurkat-Zellen+CH11) gingen wir nicht davon aus, dass es zum Auftreten von relevanter Apoptose gekommen ist. Es ergab sich in den FACS-Messungen kein Unterschied zwischen dem Einsatz von nativen PEC oder PEC-A.

3.2.4 Durchflußzytometrische Apoptosemessungen mit APO2.7

Ein weiteres Apoptosenachweisverfahren ist der Nachweis von APO2.7. Dabei erfolgt eine Markierung von Zellen mit dem monoklonalen anti-APO2.7-Antikörper. Das Erscheinen von APO2.7, einem 38 kD mitochondrialen Membranprotein, ist ein Zeichen für das Auftreten von Apoptose in einem frühen Stadium [127-129]. Auch die APO2.7 Messung erfolgte mittels Durchflußzytometrie. In unseren Experimenten war der anti-APO2.7-Antikörper mit PE konjugiert. Es ließ sich CH11-induzierte Apoptose in Jurkat-Zellen zeigen. Nach Coinkubation von Jurkat-Zellen mit einem 100% konfluenten Monolayer PEC oder PEC-A im E/T Verhältnis von 4:1, 3:1 und 2:1 konnte im Vergleich zu den Einzelzellkulturen APO2.7 nicht vermehrt nachgewiesen werden, und zwar weder nach 24 Stunden, noch nach 48 Stunden Coinkubation (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die durchgeführten durchflußzytometrischen Tests mit Annexin-FITC und APO2.7-PE in der Kokultur von PEC oder PEC-A mit Jurkat-Zellen keinen Zuwachs an Zelltod zeigten, erübrigte sich die Aufschlüsselung von Zelltod in Apoptose und Nekrose.

3.3 B7-CD28

3.3.1 Durchflußzytometrischer Nachweis von B7

Der costimulatorische Signalweg B7/CD28 kann Fas/FasL-vermittelten Apoptosesignalen entgegenwirken [116]. Maher *et al.* konnten zeigen, dass PEC und PEC-A B7 exprimieren und die Interaktion zwischen porcinem B7 und humanem CD28 funktionell wirksam ist [117]. Deshalb war es notwendig die Wechselwirkung von B7/CD28 bei der Betrachtung von Apoptose in der Kokultur von PEC oder PEC-A mit Jurkat-Zellen zu berücksichtigen. Zunächst überprüften wir die B7-Expression von PEC-A und HAEC. Die Expression von B7 auf PEC-A und die hohe Bindungsaffinität von porcinem B7 an humanes CD28 ließ sich mittels durchflußzytometrischer Tests mit dem Einsatz von huCTLA-4/mIgG_{2a}-Fc bestätigen (s. Abbildung 14). HAEC exprimierten kein B7 (s. Abbildung 15).

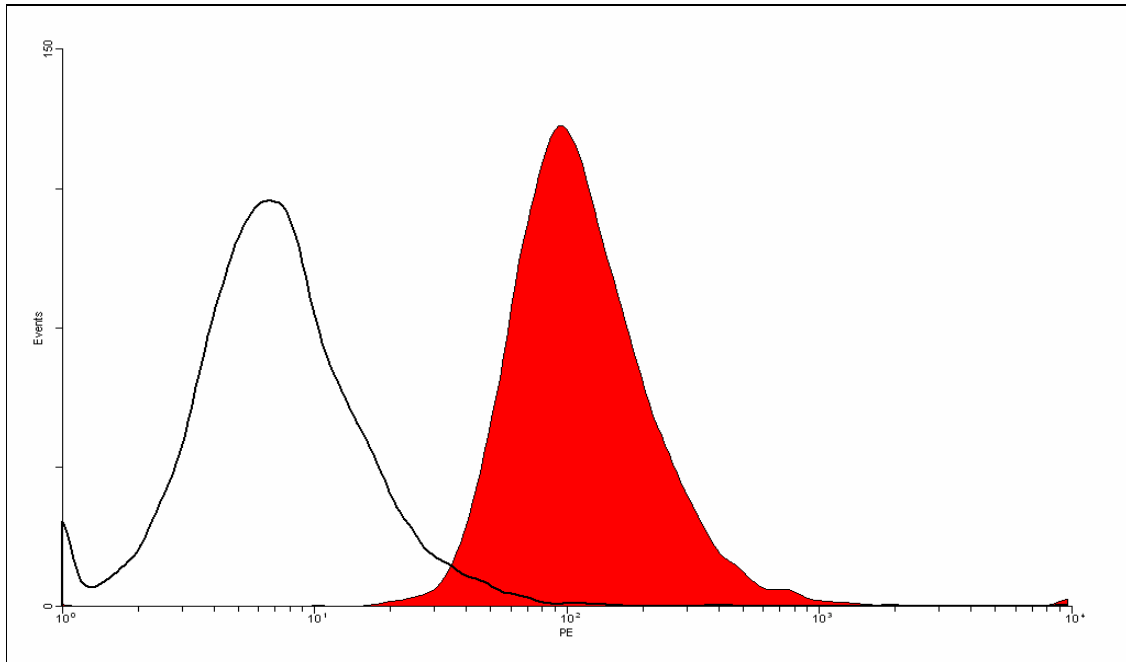


Abbildung 14: Durchflußzytometrischer Nachweis von B7 auf PEC-A. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung von hCTLA-4/mIgG_{2a}-Fc und F(ab)-PE an PEC-A. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von mIgG_{2a}/F(ab)-PE an PEC-A dar.

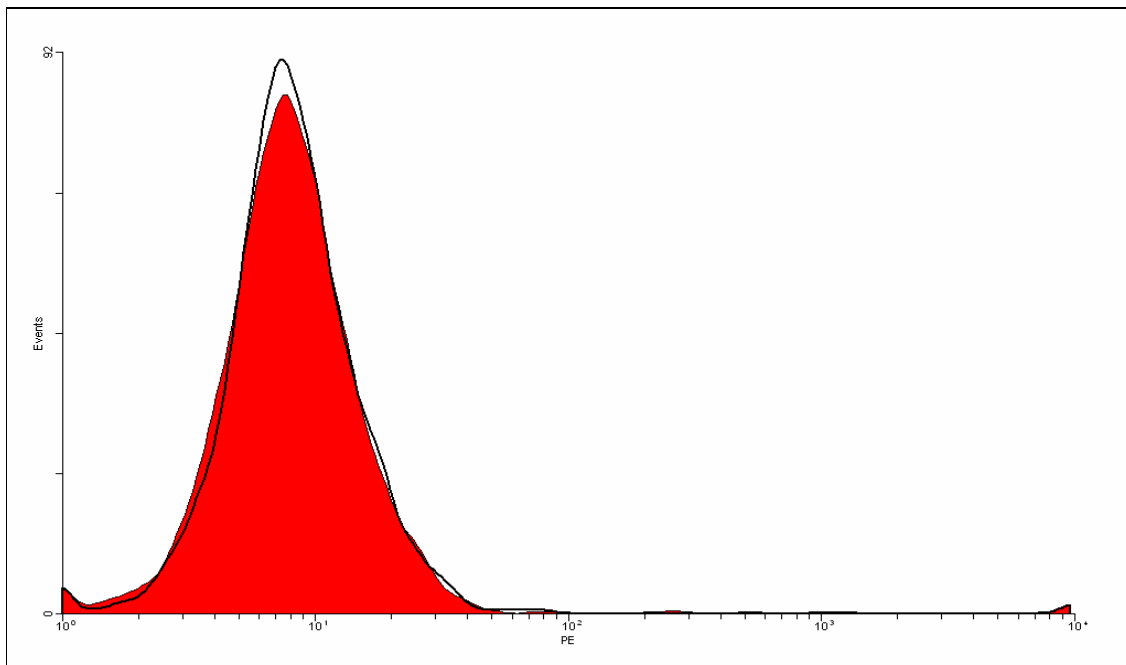


Abbildung 15: Durchflußzytometrischer Nachweis von B7 auf HAEC. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung von hCTLA-4/mIgG_{2a}-Fc und F(ab)-PE an HAEC. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von mIgG_{2a}/F(ab)-PE an HAEC dar.

3.3.2 Blockade von B7/CD28 in der Kokultur von PEC-A mit Jurkat-Zellen

Nachdem PEC und PEC-A B7 exprimieren, war es bei der Untersuchung von möglicher Apoptose in einer Kokultur mit humanen Jurkat-Zellen notwendig den costimulatorischen Signalweg B7/CD28 spezifisch zu inhibieren um möglicherweise auftretende Apoptose sichtbar zu machen.

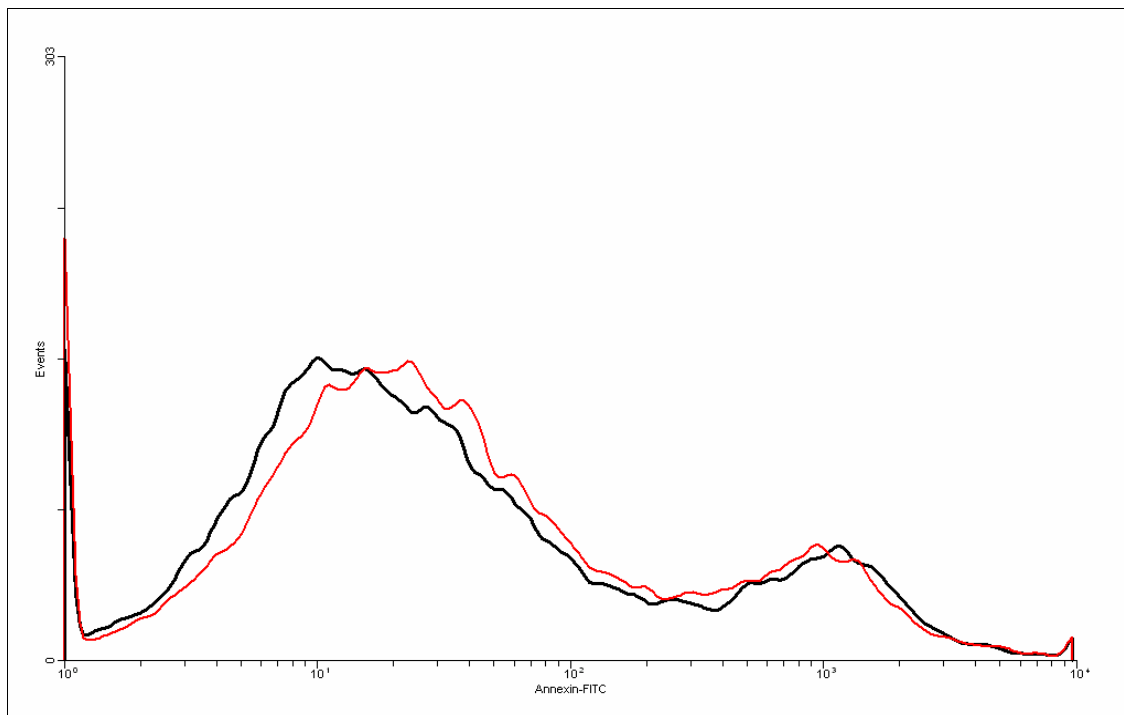


Abbildung 16: Durchflußzytometrischer Nachweis von Apoptose mit Annexin-FITC. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung von Annexin-FITC in der Kokultur Jurkat-Zellen+PEC-A nach Inhibition des B7/CD28-Signalwegs mit hCTLA-4IgG. Die schwarze Kurve stellt die spezifische Bindung von Annexin-FITC in der Kokultur Jurkat-Zellen+PEC-A ohne Inhibition des B7/CD28-Signalwegs dar.

Auch nach Hemmung des B7/CD28-Signalwegs mit CTLA4-IgG zeigten die FACS-Messungen mit Annexin-FITC keine Verschiebung der Apoptose-Kurve im Vergleich zur Messung von Jurkat-Zellen+PEC-A ohne Zugabe von CTLA4-IgG (s. Abbildung 16). Dabei betrug das E/T Verhältnis 2:1 und die Inkubationszeit 18 Stunden. Es stellte sich heraus, dass die Interaktion zwischen B7 auf PEC-A und CD28 auf Jurkat-Zellen eine potentiell auftretende und möglicherweise durch Fas/FasL-vermittelte Apoptose in der beschriebenen Kokultur von PEC-A mit Jurkat-Zellen nicht maskiert.

3.4 Transfektion von PEC-A

Unsere Resultate zeigten trotz Hemmung des costimulatorischen Signalwegs B7/CD28 keine durch PEC oder PEC-A vermittelte Apoptose in Jurkat-Zellen. Deshalb erschien eine Transfektion von PEC-A mit FasL sinnvoll. Wir arbeiteten mit einem Plasmid für humanen FasL. Der porcine FasL war zum Zeitpunkt unserer Experimente noch nicht kloniert.

In einem Vorversuch wurde zunächst die Anzahl der auszuplattierenden PEC-A bestimmt um die in den Herstellerangaben für die einzelnen Transfektionsreagenzien gewünschte Konfluenz des PEC-A-Monolayers zu erreichen. Zur Testung der potentiellen Transfizierbarkeit von PEC-A erfolgte zunächst die Transfektion von PEC-A mit einem für das „Green Fluorescence Protein“ (GFP) kodierenden Plasmidkonstrukt mit verschiedenen Transfektionsmethoden. Die Auswertung vollzog sich anhand der FACS-Analyse. Die Autofluoreszenz GFP-transfizierter Zellen entspricht dem FITC-Spektrum. Die Verschiebung der FITC-Kurve nach rechts ergab damit ein quantitatives Maß für die Transfektionseffizienz von PEC-A mit dem GFP-Plasmid.

3.4.1 Transfektion von PEC-A in Suspension

Bei der Transfektion von PEC-A in Suspension mit Lipofectamine2000 stellte sich heraus, dass nach erfolgter Transfektion nur etwa 5% der Plattenoberfläche mit adhärenen Zellen bedeckt war. Die restlichen Zellen erschienen morphologisch als Zelldetritus. Von den adhärenen Zellen waren wiederum nur 1/3 transfiziert. Dies wurde beobachtet zum Zeitpunkt 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektionsende. Damit lag die Effizienz der Transfektion von PEC-A in Suspension deutlich niedriger und die Transfektionstoxizität eindeutig höher als nach der Transfektion adhärenter Zellen.

3.4.2 Transfektion von adhärenen PEC-A

3.4.2.1 Kalzium-Phosphat-Methode

Versuche mit der Kalzium-Phosphat-Präzipitation ergaben lediglich ca. 15% transfizierte Zellen bei einer relativ hohen Zelltodrate (etwa 60%). Damit verzichteten wir auf eine weitere Optimierung dieser Methode.

3.4.2.2 Kationische Lipofektion

Die Transfektion von PEC-A mit DOTAP zeigte keinen Erfolg. 24 Stunden nach Transfektionsende wurde eine Transfektionsrate von 0% mit einer Zelltodrate von etwa 40% ersichtlich. Damit entfielen weitere Versuche mit DOTAP.

Mit Lipofectamine wurde nur eine sehr geringe Transfektionseffizienz von etwa 15% bei relativ hoher Zelltodrate erreicht. Deshalb wurde auch in diesem Fall auf eine weitere Testung verzichtet.

Versuche mit Lipofectamine Plus ergaben eine Transfektionseffizienz von etwa 30% bei relativ hoher Zelltodrate. Wegen der hohen Toxizität erübrigten sich weitere Versuche mit diesem Reagenz.

Experimente mit Lipofectamine2000 zeigten eine Transfektionseffizienz von bis zu 55%. Die parallel auftretende sehr hohe Zelltodrate konnte trotz zahlreicher Optimierungsversuche nicht maßgeblich verringert werden.

Bei Verwendung von Lipofectin lag die Transfektionsrate von PEC-A 24 Stunden nach Transfektionsende bei ca. 35%. 48 Stunden nach Transfektionsende zeigten immer noch etwa 25% der transfizierten PEC-A GFP-Expression.

Unter Berücksichtigung von Toxizität und Transfektionseffizienz stellte sich somit Lipofectin als das im Vergleich geeignetste Transfektionsreagenz für die Transfektion von PEC-A heraus. Weitere Optimierungsversuche mit pEGFP ergaben die besten Ergebnisse bei der Transfektion mit Lipofectin bei Einsatz von 2 µl Lipofectin in 100µl Opti-MEM, 1 µg DNA in 100µl Opti-MEM unter Zugabe von 0,8 ml Antibiotika-freiem und mit 10% FCS versetzten Medium und einer Transfektionsdauer von 5,5 Stunden.

Nach Darstellung der optimalen Transfektionsbedingungen für PEC-A mit pEGFP sollte nun die Transfektion von PEC-A mit einem Plasmid für hFasL und hFasLMut erfolgen. Dabei wurde der gleiche Vektor verwendet, wie in der Transfektion mit pEGFP. Die Transfektionseffizienz in den Versuchen mit dem Plasmid für hFasL oder hFasLMut war, verglichen zu den Versuchen mit pEGFP, wesentlich geringer und zeigte eine deutlich erhöhte Zelltoxizität, auch nach erneuter Variation der Transfektionsbedingungen. Es ergaben sich dabei keine Vorteile durch den Einsatz von pFasLMut. Dieses Plasmid kodiert für eine FasL Mutante, die nicht durch MMP von der Zelloberfläche abgespalten wird. Die schlechte Transfizierbarkeit von PEC-A mit hFasL war möglicherweise darauf zurückzuführen, dass sich die Zellen durch die Wechselwirkung des transfizierten hFasL mit pFas gegenseitig in die Apoptose treiben. Dies war nach Beobachtung der unbeeinflussbar hohen Toxizität der FasL Transfektion für PEC-A durchaus in Erwägung zu ziehen. PEC-A exprimieren Fas und

reagieren auf ein Signal des hFasL mit Apoptose [130]. Die Fas-Expression von PEC-A konnten wir durchflußzytometrisch nicht eindeutig belegen (s. Abbildung 17). Hierbei wurde ein muriner anti-Fas-AK verwendet, welcher mit PE konjugiert war. Eine Kreuzreaktivität des eingesetzten murinen anti-Fas-AK mit pFas liegt demnach nicht vor.

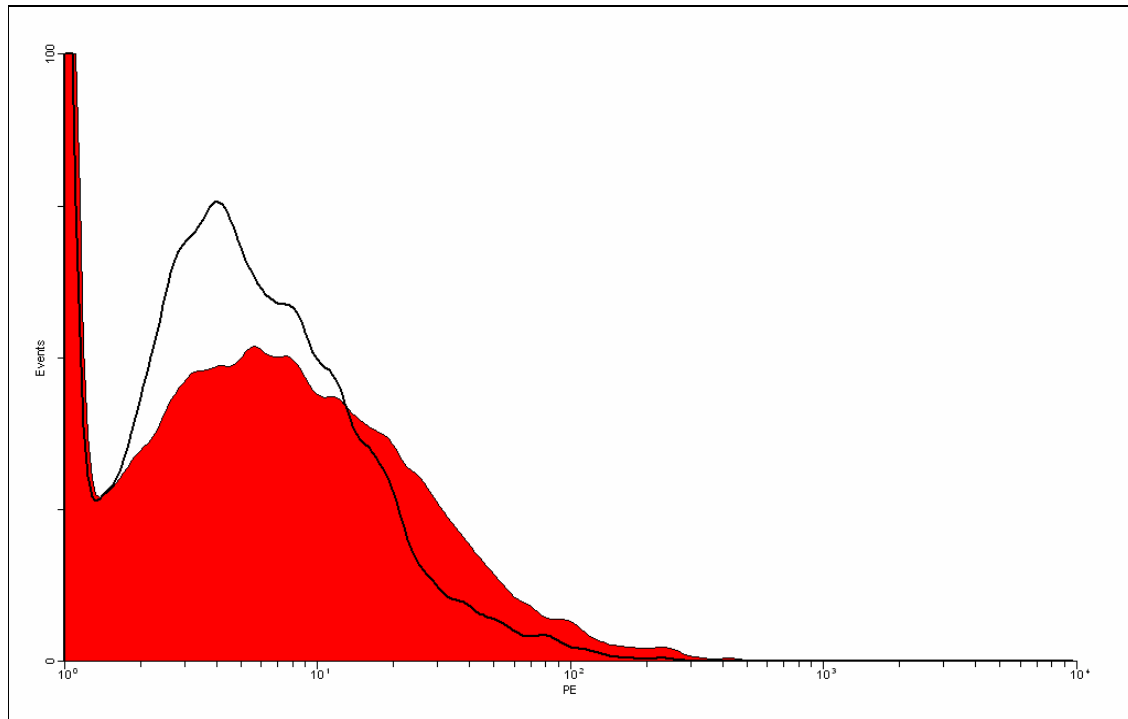


Abbildung 17: Durchflußzytometrischer Nachweis von Fas auf PEC-A. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des murinen anti-Fas-AK CD95-PE an PEC-A. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von mIgG_{2a}-PE an PEC-A dar.

FasL-induzierte Apoptose wird über die Aktivierung von Caspasen vermittelt [80]. Um FasL-induzierten Zelltod in den Fas+ PEC-A zu verhindern, wurde ein Universal-Caspase-Inhibitor, das Tripeptid zVAD-fmk, eingesetzt. Der Einsatz von zVAD-fmk zeigte Verbesserung in Bezug auf die Zelltodrate, wenngleich die Transfektionseffizienz allenfalls gering anstieg (s. Abbildung 18).

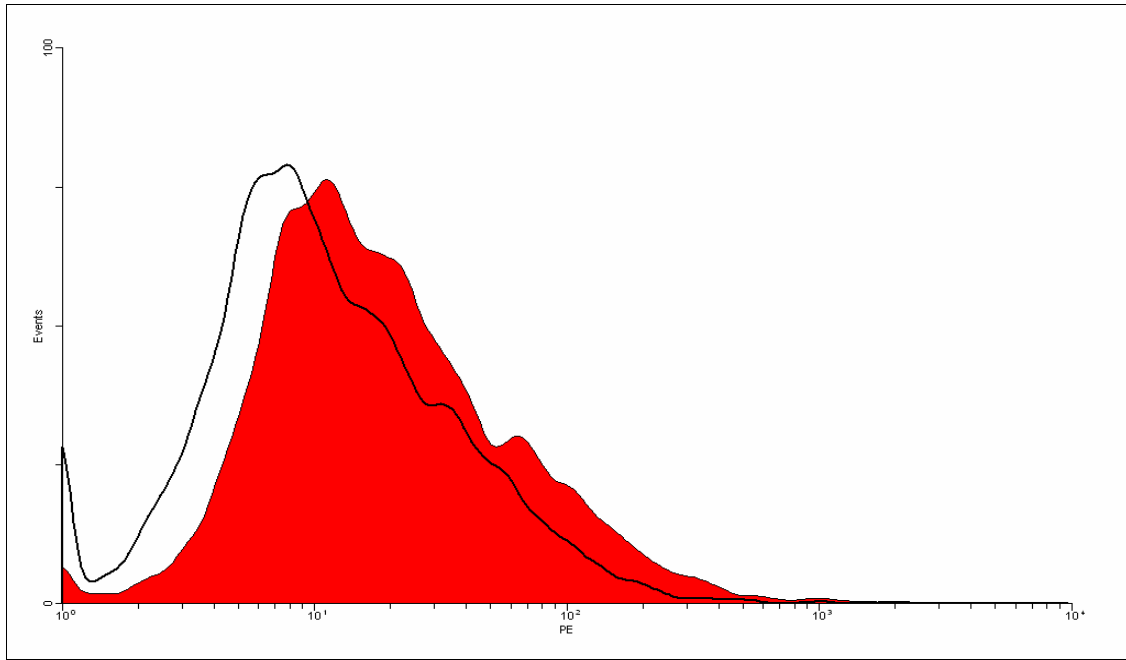


Abbildung 18: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf fixierten/permeabilisierten PEC-A; 5,5 h nach Transfektion mit einem Plasmid für hFasLMut (Lipofectin) +zVAD; 30 h nach Transfektionsende. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des murinen monoklonalen anti-FasL-AK H11-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von ratIgG_{2a}-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A dar.

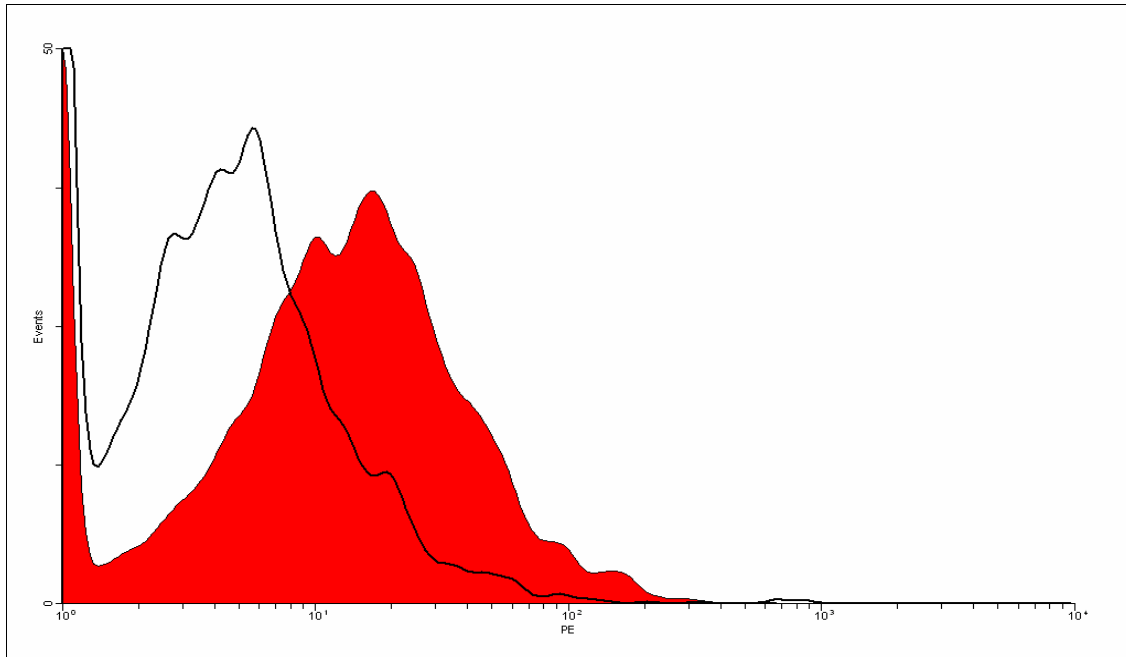


Abbildung 19: Durchflußzytometrischer Nachweis von FasL auf fixierten/permeabilisierten PEC-A; 5,5 h nach Transfektion mit einem Plasmid für hFasLMut (Lipofectin); 18 h nach Transfektionsende. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die rote Kurve zeigt die spezifische Bindung des murinen monoklonalen anti-FasL-AK H11-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A. Die schwarze Kurve stellt die unspezifische Isotyp-Bindung von ratIgG_{2a}-Biotin/Streptavidin-PE an PEC-A dar.

In weiteren Versuchen wurden die frisch mit hFasLMut transfizierten PEC-A fixiert und permeabilisiert. Diese Maßnahme sollte möglicherweise transfizierten FasL konservieren und intrazellulär auftretenden FasL nachweisen. Dadurch konnte FasL auf PEC-A in höherem Maße nachgewiesen werden, als in nicht-transfizierten PEC-A (s. Abbildung 19).

Letztendlich war aber die Effizienz der FasL-Expression auf unfixierten PEC-A trotz Optimierungsversuchen nicht ausreichend. Aufgrund der niedrigen Expression von FasL auf den mit hFasL transfizierten PEC-A erschienen weitere Versuche mit diesen Zellen, wie Apoptose-Assays mit Jurkatzellen, nicht sinnvoll.

4 Diskussion

4.1 Nachweis von FasL auf HAEC

Sata und Walsh konnten mit Einsatz eines humanen anti-FasL-Antikörpers (A11) anhand durchflußzytometrischer Methoden zeigen, dass humane aortale Endothelzellen (HAEC) FasL exprimieren und die Expression von FasL auf HAEC durch TNF α herunterreguliert wird. In einer Kokultur von HAEC und stabil mit humanem Fas (hFas) transfizierten Mastozytom-Zellen (P815-hFas-Zellen) zeigten sie Fas/FasL-vermittelte Apoptose in P815-hFasL-Zellen. Diese konnte spezifisch mit dem anti-hFasL-Antikörper 4H9 inhibiert werden. Zum Nachweis von Apoptose in P815-hFas-Zellen wurden P815-hFas-Zellen mit ^3H -Thymidin markiert und in einem Effektor/Target Verhältnis von 1:4 zu einem HAEC-Monolayer hinzugegeben. Die Kokultur wurde nach 18 Stunden mit Einsatz von Trypsin geerntet und der Prozentsatz der fragmentierten DNA in einem „Liquid Scintillation Counter“ bestimmt. Es zeigte sich eine DNA-Fragmentierung von 15%. Durch Zugabe des anti-hFasL-AK 4H9 wurde im gleichen Versuch nur noch eine DNA-Fragmentierung von etwa 1% beobachtet. In einem weiteren Experiment wurden die P815-hFasL-Zellen mit 5-Bromo-2'-Desoxy-Uridine (BrdU) markiert, wiederum zu einem HAEC-Monolayer hinzugegeben und 18 Stunden inkubiert. Die Kokultur wurde auf ein Agarosegel geladen und die DNA elektrophoretisch getrennt. Die BrdU-markierte DNA der P815-hFas-Zellen wurde mit Hilfe eines anti-BrdU-Antikörpers detektiert. Hier zeigte sich DNA-Fragmentierung in P815-hFas-Zellen, welche mit Apoptose dieser Zellen vereinbar war [83].

4.2 Nachweis von FasL auf PEC und PEC-A

Die Ergebnisse von Sata und Walsh mit HAEC veranlassten uns dazu, der Frage nachzugehen, ob es durch die Interaktion von Fas auf humanen Immunzellen und einem potentiell auf xenogenen Endothelzellen exprimierten FasL zu Apoptose kommt. Eine solche Interaktion wäre im Rahmen der Xenotransplantation relevant. Nachdem das Schwein derzeit als potentieller Organspender favorisiert wird, arbeiteten wir mit porcinen Zellen in einem xenogenen System. Anstelle von HAEC verwendeten wir PEC und PEC-A. PEC sind porcine aortale Endothelzellen, welche wir in einer Primärkultur aus frischen porcinen Aorten kultivierten (s. Präparation nativer PEC/Material und Methoden). PEC-A sind kommerziell erhältliche, immortalisierte aortale Schweineendothelzellen. Zunächst stellten wir uns die Frage ob PEC und PEC-A FasL exprimieren, der mit einem anti-FasL-Antikörper detektierbar ist.

Hierzu war es notwendig ein Nachweisverfahren für FasL zu etablieren. Der Nachweis von hFasL auf Zellen, die nach Literaturangaben hFasL exprimieren, wie HeLa-Zellen (humane Cervix-Karzinom-Zellen) [86] und HAEC [83], gestaltete sich zunächst schwierig. Erst die Verwendung des murinen anti-FasL-AK H11 oder eines Fas-Fusionsproteins (Fas-Fc), welche beide mit Biotin konjugiert waren und die anschließende Färbung mit Streptavidin-PE erbrachte eindeutige Ergebnisse (Abbildung 1, Abbildung 4, Abbildung 7, Abbildung 8). Mit unseren optimierten Nachweismethoden konnten wir FasL weder auf PEC noch auf PEC-A sicher detektieren. In späteren Arbeiten stellte sich heraus, dass PEC FasL exprimieren [131].

FasL wird ebenso wie der Tumor Nekrose Faktor (TNF) durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) von der Zelloberfläche abgespalten und existiert somit in zwei Formen, einer membrangebundenen und einer löslichen Form [124]. Der membrangebundene FasL (mFasL) hat ein Molekulargewicht von 33-43 kDa, der lösliche FasL (sFasL) von 22-26 kDa. Durch die Deletion von bestimmten Aminosäuren in jenen Bereichen des FasL-Moleküls, an denen die MMP spalten, oder durch Einsatz von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren (MMPI), kann die Abspaltung von FasL verhindert werden [98]. Unter Verwendung eines MMPI, welcher die Abspaltung von FasL durch MMP im humanen System hemmt, gelang es uns, FasL in geringem Maße auf PEC und PEC-A mit dem anti-hFasL-AK H11-Biotin und Streptavidin-PE nachzuweisen (Abbildung 10). Analog zu Versuchen mit hFasL scheint demnach auch porciner FasL durch MMP von der Zelloberfläche abgespalten zu werden. Um weitere Gewissheit zu erhalten, bedarf es der Optimierung des Einsatzes von MMPI im porcinen System und/oder der Isolierung eines porcinen MMPI. Ein spezieller porciner MMPI wäre möglicherweise effektiver. Alternativ gelang der Nachweis von FasL in geringem Maße auf PEC und PEC-A durch Fixierung und Permeabilisierung der Zellen vor Zugabe des murinen anti-FasL-AK H11-Biotin und der Färbung mit Streptavidin-PE (Abbildung 6). Auch in anderen Arbeiten wurde auf die Schwierigkeit des Nachweises von FasL hingewiesen, weil dieser intrazellulär gespeichert wird [132, 133]. In einer 2002 erschienenen Arbeit von Bouchet *et al.* gelang der eindeutige Nachweis von FasL auf der Zelloberfläche von porcinen, humanen und murinen aortalen Endothelzellen in der FACS-Analyse erst nach Permeabilisierung der Zellen. Auf der Zelloberfläche konnte dagegen kaum FasL nachgewiesen werden [133].

In der Zwischenzeit wurde das Genom des porcinen FasL (pFasL) sequenziert. RNA des pFasL ließ sich aus porcinen Thymuszellen, die genomische DNA des pFasL aus porcinen Hepatozyten extrahieren. Die Aminosäuresequenz des porcinen FasL ist bezüglich der zytoplasmatischen, transmembranären und extrazellulären Regionen zu 74,4%, 100% und 88,3% identisch mit der Aminosäuresequenz des humanen FasL (hFasL). Die Ungleichheiten

könnten neben strukturellen auch funktionelle Unterschiede zur Folge haben. Das Genom des pFasL enthält ein zusätzliches Exon, welches dazu führen könnte, dass pFasL andere Eigenschaften besitzt als sein humanes Äquivalent [134]. Es existieren Hinweise darauf, dass pFasL im Unterschied zu hFasL eine geringere Stabilität aufweist, weil die Reaktivität von pFasL mit anti-hFasL-AK stark vermindert ist [135].

Zusammenfassend ergeben sich somit mehrere Faktoren, welche den schwierigen Nachweis von FasL auf PEC und PEC-A erklären. Dazu zählen die zunehmende verminderte Kreuzreaktivität des pFasL mit den von uns verwendeten humanen und murinen anti-FasL-AK, die Abspaltung von FasL durch MMP, die intrazelluläre Speicherung von FasL und die möglicherweise verminderte Stabilität des pFasL.

2002 erschien eine Arbeit von Tsujuki *et al.* worin mittels Western Blot und PCR gezeigt werden konnte, dass PEC sowohl die genomische Anlage von pFasL enthalten als auch pFasL exprimieren. In dieser Arbeit konnte pFasL erfolgreich kloniert werden. Tsujuki *et al.* gelang es dabei aber nicht pFasL mit einem Antikörper nachzuweisen [131].

4.3 Apoptosemessungen nach Kokultur von Jurkat-Zellen mit PEC oder PEC-A

Wir gingen weiter der Frage nach, ob pFasL in einem, mit dem Gefäßlumen vergleichbaren *in vitro* System bei hFas+ Zellen Apoptose auslösen kann. Muneta *et al.* zeigten, dass ein von pFasL ausgehendes Signal zum Zelltod von pFas+ Zellen führt [135]. Motegi-Ishiyama *et al.* konnten in einem xenogenen Modell beobachten, dass hFasL in pFas Zellen Apoptose induziert [134]. Die Wechselwirkungen pFasL/pFas und hFasL/pFas können folglich Apoptose der Fas+ Zelle auslösen.

Im allogenen, humanen Modell von Sata und Walsh verwendeten diese P815-hFas-Zellen als Fas+ Zielzellen zum Nachweis von FasL-induzierter Apoptose durch HAEC. Wir arbeiteten in unserem xenogenen Modell mit humanen Jurkat-Zellen, welche bekanntlicherweise Fas exprimieren. Zunächst wurde die Fas-Expression von Jurkat-Zellen überprüft und bestätigt. Daraufhin versuchten wir, in Anlehnung an die Arbeit von Sata und Walsh, ein Modell zu etablieren, welches der Situation im Gefäßlumen möglichst nahe kommen sollte. PEC oder PEC-A dienten als Effektorzellen und wurden als konfluenter Monolayer eingesetzt. Dieser sollte die Endotheloberfläche einer Gefäßwand repräsentieren. Dem PEC- oder PEC-A-Monolayer wurden Zielzellen (Jurkat-Zellen) im Effektor/Target Verhältnis von 4:1, 3:1 oder 2:1 zugegeben. Im Anschluss erfolgte eine 18, 24, 36 oder 48-stündige Inkubation der Kokultur. Nach Aufarbeitung dieser Zellen und durchflußzytometrischer Messung mit

Annexin-FITC und APO2.7-PE konnten wir keine Apoptose beobachten. Es ergaben sich gleiche Ergebnisse beim Einsatz von PEC und PEC-A. Damit fand sich zumindest in unserer Versuchsanordnung kein Unterschied der Apoptose-auslösenden Kompetenz beim Vergleich von nativen PEC mit der immortalisierten Zelllinie PEC-A. Unsere Apoptosemessungen mit dem JAM-Test zeigten zunächst hohe Apoptoseraten in Jurkat-Zellen (Abbildung 12). Dies stellte sich allerdings als Artefakt heraus. Der JAM-Test eignete sich nicht zur Apoptose-Messung in unserem System, da mit besonders adhärenenten Zellen (PEC und PEC-A) gearbeitet wurde. Auch in einer Arbeit von Böhm *et al.* wurde darauf hingewiesen, dass der JAM-Test zum Nachweis von Apoptose nicht geeignet ist, wenn stark adhärenente Zellen verwendet werden [126].

In der 2002 erschienenen Arbeit „Cloning and potential utility of porcine Fas ligand: overexpression in porcine endothelial cells protects them from attack by human cytolytic cells“ konnten Tsujuki *et al.* mit dem JAM-Test nachweisen, dass PEC dazu in der Lage sind, humane Jurkat-Zellen über den Fas/FasL-Signalweg zu lysieren und umgekehrt. Diese Lyse konnte spezifisch durch den anti-hFas-AK G247-4 dosisabhängig gehemmt werden. In den Versuchen von Tsujuki *et al.* wurden PEC mit Jurkat-Zellen in einem E/T Verhältnis von 1:1 bis 10:1 (PEC/Jurkat-Zellen) 4 Stunden inkubiert. Im JAM-Test zeigte sich in dieser Arbeit eine DNA-Fragmentierung von etwa 20% bei einem E/T Verhältnis von 1:1 und von bis zu 42% bei einem E/T Verhältnis von 10:1 [131]. Im Unterschied zu unseren Versuchen arbeiteten Tsujuki *et al.* nicht mit einem PEC-Monolayer sondern mit einer PEC-Suspension, welche direkt zu Jurkat-Zellen, humanen T-Zellen, humanen NK-Zellen oder COS-Zellen zugegeben wurden. Damit erklärt sich vielleicht der Umstand, dass eine Auswertung der Ergebnisse mit dem JAM-Test möglich war, da die Zellen wahrscheinlich nicht so stark an der Plattenoberfläche adhärenierten wie in unseren Experimenten. Zum anderen war die Länge der Coinkubation der Effektor- mit den Targetzellen wesentlich kürzer (4 Stunden gegenüber ≥ 18 Stunden in unseren Versuchen). Die kürzere Verweildauer der Zellen in den Platten bei Tsujuki *et al.* könnte eine verminderte Adhärenz der Zellen an der Plattenoberfläche erklären und damit den Einsatz des JAM-Tests zur quantitativen Bestimmung von Apoptose möglich gemacht haben.

Warum konnten wir im Gegensatz zu Tsujuki *et al.* keine Apoptose in einer Kokultur von menschlichen Jurkat-Zellen mit PEC nachweisen? Möglich wäre, dass die von uns verwendeten durchflußzytometrischen Nachweismethoden Apoptose nicht empfindlich genug zeigen konnten. Gegen eine unzureichende Sensitivität unserer durchflußzytometrischen Apoptosemessungen mit Annexin-FITC und APO2.7-PE spricht jedoch, dass in unseren

Messungen Fas-induzierte Apoptose in Jurkat-Zellen mit dem apoptoseinduzierenden anti-hFas-AK CH11 eindeutig zu zeigen war (Abbildung 13).

Letztendlich ist davon auszugehen, dass die divergierenden Ergebnisse aus den unterschiedlichen Versuchsbedingungen resultieren. Tsujuki *et al.* verwendeten eine PEC-Suspension während wir mit einem adhärennten PEC-Monolayer arbeiteten. Das E/T Verhältnis bei Tsujuki *et al.* lag bei bis zu 10:1, wir verwendeten dagegen ein E/T Verhältnis von 4:1 und niedriger. Dabei zeigten sich deutliche Apoptoseraten in der Arbeit von Tsujuki *et al.* erst bei einem E/T Verhältnis von 10:1.

Kritisch anzumerken ist dabei, dass die hohen E/T Verhältnisse von bis 10:1, welche in den Experimenten von Tsujuki *et al.* verwendet wurden, nicht der Situation im Gefäßlumen entsprechen dürften. Auch der Einsatz von PEC als Zellsuspension und nicht als Monolayer wird der *in vivo* Situation wenig gerecht. Einen eher geringen Einfluß auf die Apoptoserate dürften die ungleichen Inkubationszeiten gehabt haben. Im Grunde sollte in unserem Modell nach 18 Stunden Coinkubation Apoptose messbar sein, da Tsujuki *et al.* schon nach 4 Stunden Coinkubation Apoptose zeigen konnten. Für unser System eignete sich der JAM-Test aufgrund der starken Adhärenz der Zellen in den Platten nicht, wohingegen die Resultate von Tsujuki *et al.* vorwiegend auf dem JAM-Test basieren. In diesem Punkt dürfte die unterschiedliche Inkubationszeit durchaus von Bedeutung gewesen sein. PEC und PEC-A adhärten nach ihrem Einsatz als Monolayer und einer zusätzlichen 18-stündigen Inkubation mit Jurkat-Zellen zu stark an die Plattenoberfläche und sowohl Effektor- als auch Target-Zellen wurden, wie in unseren Ergebnissen zu sehen war, zu einem hohen Prozentsatz in den gespülten Platten zurückgehalten.

Zusammenfassend ergibt sich, basierend auf den Ergebnissen von Tsujuki *et al.*, dass Apoptose über den Fas/FasL-Signalweg nach Inkubation einer PEC-Suspension mit hFas+ Zielzellen bei einem ausreichend hohen E/T Verhältnis stattfindet. Dies entspricht allerdings nicht der Situation im Gefäßlumen.

4.4 Transfektion von PEC-A mit FasL

In unseren Experimenten war keine Apoptose in Jurkat-Zellen nach Kokultur mit einem Monolayer der nativen Zelllinie PEC oder der immortalisierten Zelllinie PEC-A zu beobachten (Abbildung 13). Deshalb erschien die Transfektion von PEC-A mit hFasL sinnvoll. Durch die Expression von hFasL könnte sich ein porcines Transplantat möglicherweise durch Induktion von Apoptose in angreifenden Fas+ Immunzellen vor Abstoßung schützen. Tran *et al.* gelang es, bovine aortale Endothelzellen (BAEC) mit hFasL zu transfizieren. Die Transfektion erfolgte

mit Lipofectamine. Damit wurde eine transiente Transfektion von 10% der primär eingesetzten BAEC erreicht [136]. Analog zu den Experimenten mit bovinen aortalen Endothelzellen versuchten wir immortalisierte porcine aortale Endothelzellen (PEC-A) mit hFasL zu transfizieren. Unsere Vorversuche hierzu, mit einem für das „Green Fluorescence Protein“ (GFP) kodierenden Plasmid und verschiedenen Transfektionsmethoden konnten zeigen, dass eine transiente Transfektion von PEC-A zu erreichen ist. Nach Optimierung wurde mit Lipofectin eine Transfektionsrate von 35% nach 24 Stunden und 25% nach 48 Stunden erreicht. Im Gegensatz dazu waren analoge Versuche mit Plasmiden, welche für die native Form von hFasL oder die membranständige Form von hFasL kodierten wenig erfolgreich. Mit unserer etablierten sensitiven Nachweismethode für hFasL mit H11-Streptavidin/Biotin-PE mittels Durchflußzytometrie ließ sich FasL auf PEC-A weder nach Transfektion mit dem Plasmid der nativen Form des hFasL noch mit dem Plasmid der membranständigen Form des hFasL (hFasLMut) nachweisen. Dabei zeigte sich die hohe Zelltoxizität als limitierender Faktor. Die Transfektion mit hFasL und hFasLMut erwies sich als wesentlich toxischer als analoge Versuche mit pEGFP. Dabei wurde der gleiche Plasmidvektor eingesetzt.

PEC-A exprimieren Fas und können auf ein Signal von hFasL mit Apoptose reagieren [130]. Eine Ursache für die schwierige Transfektion von PEC-A mit hFasL könnte demnach sein, dass FasL-überexprimierende PEC-A gleichzeitig Fas exprimieren und sich folglich über die Interaktion der beiden Liganden auf benachbarten Zellen gegenseitig in die Apoptose treiben oder durch die Expression von Fas und FasL auf derselben Zelle apoptotisch werden. Über die Problematik des Selbstmords Fas exprimierender Zellen nach Transfektion mit FasL wurde in anderen Arbeiten berichtet. Eine stabile Transfektion sei in dieser Konstellation nicht zu erreichen. Die Expression von FasL in mit FasL transfizierten Zellen, welche Fas koexprimieren, resultiere in Apoptose und der Unmöglichkeit stabile Zelllinien zu erhalten [137]. Zunächst dachten wir nicht an einen potentiellen Selbstmord von PEC-A nach Transfektion mit hFasL, da humane aortale Endothelzellen (HAEC) normalerweise gegenüber FasL-vermitteltem Zelltod resistent sind. Durch die Inkubation mit OxLDL werden HAEC allerdings gegenüber Fas-vermitteltem Zelltod sensibel und es kommt über die Interaktion Fas/FasL zum Selbstmord in HAEC [138]. Innerhalb der Population mit hFasL transfizierten BAEC wurden keine zytotoxischen Effekte nachgewiesen [136]. Dies könnte daran gelegen haben, dass BAEC kein Fas exprimieren oder aber auch daran, dass bovines Fas nicht mit hFasL interagiert und damit das apoptotische Signal ausbleibt.

Durch den Einsatz eines Caspaseinhibitors (z-VAD-fmk) und Permeabilisierung der transfizierten Zellen in unseren Versuchen verbesserte sich zwar das Zellbild nach

Transfektion, die Transfektionsrate war aber weiter niedrig (s. Ergebnisse/Abbildung 18). Diese Beobachtungen könnten für eine „Selbst-Apoptose“ der mit hFasL transfizierten PEC-A sprechen. Abgesehen von der hohen Zelltodrate in unseren Experimenten war der transfizierte hFasL in geringem Maße nur nach Fixierung und Permeabilisierung der transfizierten PEC-A nachweisbar. Daraus läßt sich schließen, dass zumindest ein Teil des transfizierten hFasL intrazellulär vorhanden war. Boosi und Griffiths beobachteten, dass neu synthetisierter hFasL in speziellen Sekretionslysosomen gespeichert und dessen Transport an die Zelloberfläche durch polarisierte Degranulation kontrolliert wird [132].

Tsujuki *et al.* gelang es (nachdem die Experimente der vorliegenden Arbeit abgeschlossen waren) pFasL zu klonieren und sowohl COS-Zellen als auch PEC mit diesem zu transfizieren. Sie verwendeten hierzu, ebenso wie wir, die transiente Transfektion mit Lipofectin. Sie arbeiteten mit dem Einsatz von 10 µg Plasmid-DNA und 55 µg Lipofectin in 4 ml Opti-MEM. Die Transfektionsdauer betrug 5 Stunden (PEC) bzw. 6 Stunden (COS). Die Transfektion wurde durch die Zugabe einer äquivalenten Menge von Opti-MEM, welches mit 20% FCS versetzt war, gestoppt. Am ersten Tag nach Transfektion wurde das Medium ersetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion für Experimente verwendet. Im Unterschied hierzu arbeiteten wir mit 2 µl Lipofectin und 1 µg DNA in jeweils 100 µl Opti-MEM und 0,8 ml Antibiotika-freiem Medium, welches mit 10% FCS versetzt war. Als optimale Transfektionsdauer in unseren Experimenten ergaben sich 5,5 Stunden.

Ursachen für die mangelhafte Transfektionseffizienz in unseren Versuchen könnten die unterschiedlichen Transfektionsbedingungen und die Verwendung des humanen Transgens für FasL gewesen sein. Tsujuki *et al.* verwendeten im Unterschied zu uns porcinen FasL. Dabei gelang es Tsujuki *et al.* jedoch nicht, einen AK zu finden, um pFasL durchflußzytometrisch nachzuweisen und die tatsächliche Transfektionsrate direkt zu bestimmen. Bei den mit pFasL transfizierten Zellen ergab sich beim Vergleich mit den nicht-transfizierten Zellen im JAM-Test eine höhere Rate an DNA-Fragmentierung in den Effektor-Zellen (Jurkat-Zellen/T-Zellen/NK-Zellen). Zusätzlich zeigte der Einsatz von mit pFasL transfizierten PEC als Target-Zellen eine niedrigere Rate an DNA-Fragmentierung nach Kokultur mit Jurkat-Zellen im Gegensatz zu analogen Versuchen mit nativen PEC als Target-Zellen. Damit erklärten Tsujuki *et al.* die erfolgreiche Transfektion von PEC mit pFasL. Diesen Ergebnissen zufolge ist die transiente Transfektion von PEC mit pFasL möglich und sinnvoll. Tsujuki *et al.* beschrieben keine Zelllyse nach Transfektion von PEC mit pFasL [131]. In einer 2004 erschienenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Transfektion von porcinen Zellen mit hFasL möglich ist. Dabei wurden allerdings nicht PEC oder PEC-A, sondern die porcine endotheliale

Knochenmarkszelllinie 2A2 stabil mit hFasL transfiziert. Dies gelang mit Kalziumphosphat und Elektroporation. Die Problematik einer, durch die gleichzeitige Expression von Fas und FasL auf einer Zelle bedingten, Selbst-Apoptose mußte dabei nicht berücksichtigt werden, da 2A2-Zellen im Gegensatz zu PEC und PEC-A kein Fas exprimieren [139].

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Transfektion von PEC mit pFasL und die Transfektion der porcinen endothelialen Knochenmarkszelllinie 2A2 mit hFasL möglich ist. Uns gelang es hingegen nicht, die immortalisierte Zelllinie PEC-A ausreichend mit hFasL zu transfizieren. Als mögliche Ursache ist die Verwendung eines humanen Transgens in Erwägung zu ziehen. Auch eine Selbst-Apoptose der mit hFasL transfizierten PEC-A ist denkbar. Gegen die Selbst-Apoptose von PEC-A nach Transfektion mit hFasL spricht das Ergebnis einer 2002 erschienenen Arbeit von Bouchet *et al.*. Hier wurde nachgewiesen, dass ein erhöhter FLIP-Level in PEC diese vor Selbst-Apoptose schützt [133]. Fraglich ist, ob ein erhöhter FLIP-Level auch in PEC-A vorliegt. Aus unseren Ergebnissen läßt sich folgern, dass PEC-A unter den aufgeführten Transfektionsbedingungen und unter Verwendung von Lipofectin als Transfektionsreagenz nicht ausreichend mit hFasL zu transfizieren sind. Vielleicht würden sich durch eine alternative Transfektionsmethode, wie beispielsweise der Magnetofektion bessere Ergebnisse erzielen lassen. Krötz *et al.* konnten in einer 2003 erschienenen Arbeit zeigen, dass die Magnetofektion, insbesondere in Kombination mit der polykationischen Komponente Polyethyleneimine, eine billigere und deutlich effizientere Möglichkeit bietet, HUVEC und native PEC zu transfizieren als die von uns eingesetzte Lipofektion. Trotz der vergleichsweise erhöhten Zelltoxizität ergab sich hierbei nämlich eine um mehr als hundertfach größere Transfektionseffizienz. Die Magnetofektion bietet auch deutliche Vorteile gegenüber der Transfektion durch Elektroporation oder viralen Gentransfer. Die Elektroporation erfordert nämlich eine teure Ausstattung und gilt als eine Methode mit hoher Zelltoxizität. Beim viralen Gentransfer sind überdies strenge Sicherheitsmaßnahmen einzuhalten. Zudem kann es zur Verfälschung der Ergebnisse durch das Auftreten von Virusproteinen kommen. Die Magnetofektion könnte durch ihre hohe Transfektionseffizienz und ihre einfache Handhabung auch eine Möglichkeit zum *in vivo* Gen-Transfer bieten [140].

4.5 Aktivierung humaner T-Zellen im xenogenen System

PEC sind im Gegensatz zu HAEC dazu in der Lage, den humanen T-Zell-Rezeptor (TCR) mit der direkten Präsentation von porcinem MHC/Antigen zu aktivieren und fungieren als antigenpräsentierende Zellen (APC) [141, 142]. Anzunehmen ist, dass porcinen Endothelzellen

dadurch eine wichtigere Funktion in der Immunregulation eingeräumt werden kann als humanen Endothelzellen.

Im humanen System führt die alleinige Aktivierung des TCR ohne einen zusätzlichen Costimulus zur gesteigerten Apoptose über den Fas/FasL-Signalweg in der Population der APC und/oder der Effektor-T-Zellen. Ein zusätzlicher Costimulus führt zur Vermeidung dieses Mechanismus. Viele T-Zell-Moleküle können als Rezeptoren für costimulatorische Signale dienen. Die am besten charakterisierten costimulatorischen Moleküle auf APC sind die strukturverwandten Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Sie sind homodimere Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie. Man findet sie ausschließlich auf der Oberfläche von Zellen, die das T-Zell-Wachstum anregen können. Der Rezeptor für B7 auf der T-Zelle ist das Molekül CD28, ebenfalls ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie. Eine Bindung von CD28 an B7 oder an Anti-CD28-AK costimuliert das Wachstum nativer T-Zellen. Bei nativen T-Zellen ist CD28 der einzige Rezeptor für B7 [115]. T-Zellen können aber auch CTLA4 exprimieren. CTLA4-IgG setzt sich aus der extrazellulären Domäne von CTLA4 und der konstanten Region von IgG1 zusammen und bindet an B7 mit höherer Affinität als CD28. Deswegen ist es in der Lage, als potenter kompetitiver Inhibitor des B7/CD28-Signalweges und damit der T-Zell-Costimulation zu fungieren [116].

Maher *et al.* konnten nachweisen, dass PEC und PEC-A im Gegensatz zu HAEC B7 exprimieren. Außerdem konnten sie zeigen, dass die Interaktion von humanem CD28 und porcinem B7 funktionell wirksam ist und zur Aktivierung humaner T-Zellen führt [117]. Die Expression von B7 auf PEC-A ließ sich auch in unseren Ergebnissen zeigen (Abbildung 14).

Die Tatsache, dass in unseren Versuchen keine Apoptose in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit PEC oder PEC-A beobachtet werden konnte, war möglicherweise darauf zurückzuführen, dass ein von PEC und PEC-A ausgehendes costimulatorisches Signal über B7/CD28 zu einer Proliferation der Jurkat-Zellen führt und die Fas/FasL-vermittelte Apoptose in Jurkat-Zellen verringert. Genau dieses Phänomen konnte in humanen FasL+/B7+ Dendritischen Zellen gegenüber Jurkat-Zellen beobachtet werden [116]. Durch die Interaktion von PEC mit einer humanen T-Zelle über den T-Zell-Rezeptor und den costimulatorischen Signalweg B7/CD28 könnten PEC und PEC-A die Expression von Fas auf humanen T-Zellen verringern und somit T-Zell-Rezeptor getriggerten Zelltod vermindern (s. Abbildung 20).

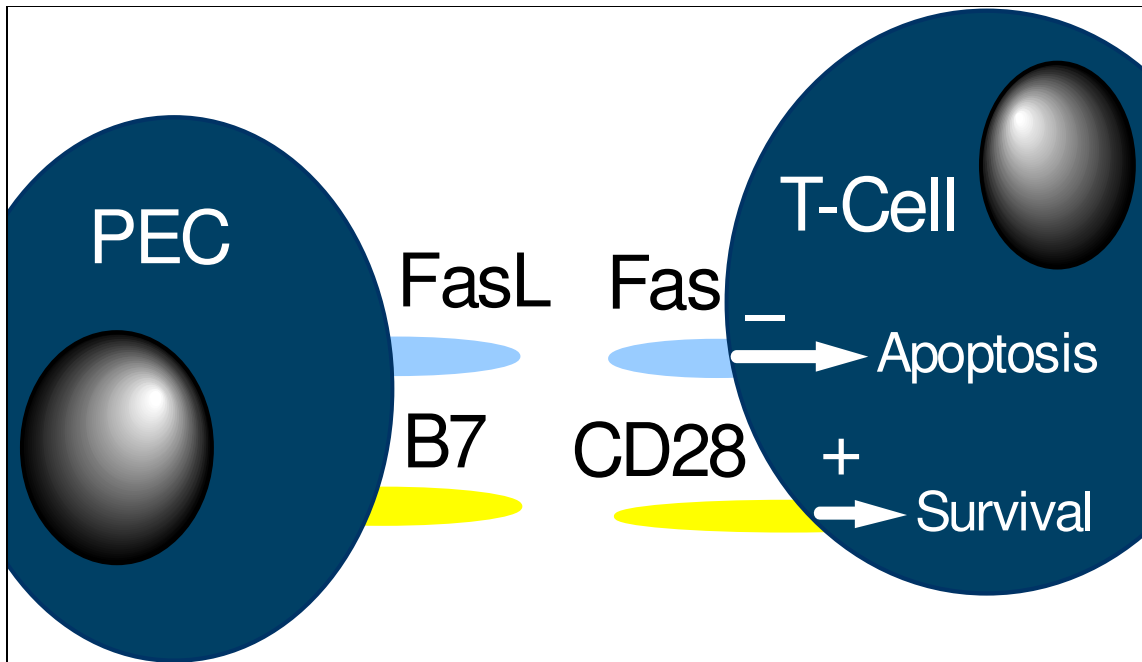


Abbildung 20: Mögliche Interaktion PEC/humane T-Zelle

Wir inhibierten den Signalweg B7/CD28 in der Kokultur von PEC-A mit Jurkat-Zellen mit CTLA4-IgG. Dennoch konnte in unseren Versuchen keine Apoptose in Jurkat-Zellen beobachtet werden (s. Abbildung 16). Ein postulierte über den TCR/CD3 Rezeptor vermitteltes Signal ohne Costimulus, welches im humanen System die Apoptoserate in Fas+ Zellen erhöht, führte in unserem xenogenen System nicht zu vermehrter Apoptose.

4.6 Zusammenfassung

Viele Menschen befinden sich aufgrund eines akuten oder chronischen Organversagens in einem lebensbedrohlichen Zustand. Einem beträchtlichen Teil dieser Patienten könnte durch geeigneten Ersatz des erkrankten Organs ein Weiterleben ermöglicht werden. Da humane Spenderorgane nur begrenzt verfügbar sind, stellt die Xenotransplantation eine attraktive Möglichkeit dar, um diesen Organmangel zu beheben. Als vielversprechendes Spendertier gilt momentan das Schwein. Die Abstoßungsreaktionen gegenüber porcinen Xenotransplantaten sind allerdings noch nicht kontrollierbar. Deshalb besteht im Augenblick die Hauptanstrengung der gegenwärtigen Forschung darin, neue Strategien zu entwickeln, die eine Kontrolle dieser Immunreaktionen erlauben. Eine Möglichkeit ist die Induktion des programmierten Zelltodes in Immunzellen, die ein Transplantat angreifen. Zu diesem Zweck werden Liganden eingesetzt, welche rezeptorvermittelte Apoptose in Zielzellen auslösen können. Einer der am besten charakterisierten Liganden ist Fas-Ligand (FasL). FasL induziert Apoptose in Fas+ Zellen, zu denen auch T-Lymphozyten zählen. Zielsetzung unserer Arbeit war es, zu untersuchen, ob

porciner Fas-Ligand (pFasL) auf aortalen Schweineendothelzellen exprimiert wird und ob dieser mit humanem Fas auf der T- Lymphozytenzelllinie Jurkat interagiert.

Hierzu wurde versucht, pFasL auf nativen aortalen Schweineendothelzellen (PEC) und immortalisierten aortalen Schweineendothelzellen (PEC-A) mit kommerziellen anti-FasL-AK zu detektieren. Unter Einsatz von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren sowie nach Permeabilisierung und Fixierung der Zellen konnte FasL sowohl auf PEC als auch auf PEC-A in geringem Maße nachgewiesen werden. In weiteren Experimenten wurde mit einer Kokultur von PEC sowie PEC-A mit humanen T-Zellen (Jurkat-Zellen) gearbeitet. Dabei konnte beim Einsatz von PEC und PEC-A als Monolayer nach Inkubation mit Jurkat-Zellen in E/T-Verhältnissen von 4:1, 3:1 und 2:1 im Vergleich zu den jeweiligen Monokulturen mit keiner der verwendeten Methoden Apoptose beobachtet werden. Der JAM-Test erwies sich in unserem System aus technischen Gründen als nicht geeignet für den Nachweis von Apoptose. Versuche PEC-A mit hFasL zu transfizieren waren mit sehr hoher Zelltoxizität verbunden. Der transfizierte hFasL wurde teilweise auch intrazellulär gespeichert.

Weiterhin konnten wir die Expression von B7 auf PEC-A bestätigen. Ein Apoptosenachweis bei Jurkat-Zellen wurde auch durch die Blockade der Interaktion zwischen B7 auf PEC-A und CD28 auf Jurkat-Zellen nicht erreicht.

4.7 Ausblick

Unseren Ergebnissen zufolge erscheint der Gentransfer des apoptoseinduzierenden FasL in Endothelzellen eines porcinen Organtransplantats grundsätzlich sinnvoll, um porcine Endothelzellen vor dem Angriff durch humane Fas+ Immunzellen zu schützen.

Zu bedenken ist aber, dass die Interaktion von Fas und FasL nicht immer und nicht ausschließlich zu Apoptose führt. Insbesondere zu berücksichtigen ist in diesem Zusammenhang die Vermittlung von inflammatorischen Signalen, welche zu einer beschleunigten Abstoßung FasL-transgener Transplantate führen können. Die Auswirkung der Fas/FasL-Interaktion ist dabei von vielen, teilweise noch unklaren Faktoren und vom Transplantationssitus abhängig. Generell erscheint es wichtig, die Fas/FasL-Wechselwirkung nicht isoliert, sondern möglichst im konkreten *in vivo* Modell zu betrachten.

5 Literaturverzeichnis

1. Calne, R., *New frontiers in transplantation*. Transplant Proc, 2000. **32**(7): p. 1454-5.
2. Cooper, D.K., C.G. Groth, and I.F. McKenzie, *Xenotransplantation. This new form of treatment might benefit millions*. Bmj, 2000. **320**(7238): p. 868.
3. Groth, C.G., *Presidential address: why xenotransplantation?* Transplant Proc, 2000. **32**(5): p. 833.
4. Haniel, A., T. Rendtorff, and E.-L. Winnacker, *Zur ethischen Beurteilung der Xenotransplantation*, in *Stellungnahme des Instituts Technik-Theologie-Naturwissenschaften*. 1999, Institut für Technik-Theologie-Naturwissenschaften, Marsstraße 19, 80 335 München: München. p. 1-14.
5. Tullius, S.G. and N.L. Tilney, *Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection*. Transplantation, 1995. **59**(3): p. 313-8.
6. Fishman, J.A., *Xenotransplantation from swine: making a list, checking it twice*. Xenotransplantation, 2000. **7**(2): p. 93-5.
7. Platt, J.L., *New directions for organ transplantation*. Nature, 1998. **392**(6679 Suppl): p. 11-7.
8. Rodriguez Umana, H., *Grafting of bone from a dog into the human skull: an historical note*. Plast Reconstr Surg, 1995. **96**(6): p. 1481.
9. Reemtsma, K., et al., *Renal Heterotransplantation in Man*. Ann Surg, 1964. **160**: p. 384-410.
10. Starzl, T.E., et al., *Renal Heterotransplantation from Baboon to Man: Experience with 6 Cases*. Transplantation, 1964. **12**: p. 752-76.

11. Hardy, J.D., et al., *Heart Transplantation in Man. Developmental Studies and Report of a Case*. *Jama*, 1964. **188**: p. 1132-40.
12. Deodhar, S.D., *Review of xenografts in organ transplantation*. *Transplant Proc*, 1986. **18**(3 Suppl 2): p. 83-7.
13. Barnard, C.N., A. Wolpowitz, and J.G. Losman, *Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass*. *S Afr Med J*, 1977. **52**(26): p. 1035-8.
14. Bailey, L.L., et al., *Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate*. *Jama*, 1985. **254**(23): p. 3321-9.
15. Czaplicki, J., B. Blonska, and Z. Religa, *The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human*. *J Heart Lung Transplant*, 1992. **11**(2 Pt 1): p. 393-7.
16. Starzl, T.E., et al., *Baboon-to-human liver transplantation*. *Lancet*, 1993. **341**(8837): p. 65-71.
17. Deacon, T., et al., *Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease*. *Nat Med*, 1997. **3**(3): p. 350-3.
18. Larsson, L.C. and H. Widner, *Neural tissue xenografting*. *Scand J Immunol*, 2000. **52**(3): p. 249-56.
19. Ildstad, S.T., *Xenotransplantation for AIDS*. *Lancet*, 1996. **347**(9003): p. 761.
20. Allan, J.S., *Xenotransplantation at a crossroads: prevention versus progress*. *Nat Med*, 1996. **2**(1): p. 18-21.
21. Chapman, L.E., et al., *Xenotransplantation and xenogeneic infections*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(22): p. 1498-501.

22. Schmoeckel, J.M., *Xenotransplantation HDAF-transgener Schweineherzen: Untersuchungen ex vivo und im Primatenmodell*. 1998, Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi im Fach Herzchirurgie; Ludwig-Maximilians-Universität München: p. 1-143; ISBN 3-934252-95-8.
23. Socha, W.W. and J. Moor-Jankowski, *Survival of cardiac xenografts in rhesus monkeys*. *Transplantation*, 1991. **52**(1): p. 181-2.
24. Kennedy, I. and H. Sewell, *Xenotransplantation moratorium*. *Nat Biotechnol*, 1998. **16**(2): p. 120.
25. Soin, B., C.M. Vial, and P.J. Friend, *Xenotransplantation*. *Br J Surg*, 2000. **87**(2): p. 138-48.
26. Calne, R.Y., *Organ transplantation between widely disparate species*. *Transplant Proc*, 1970. **2**(4): p. 550-6.
27. Platt, J.L., *Xenotransplantation. New risks, new gains*. *Nature*, 2000. **407**(6800): p. 27, 29-30.
28. Polejaeva, I.A., et al., *Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells*. *Nature*, 2000. **407**(6800): p. 86-90.
29. Platt, J.L., *Approaching clinical application of xenotransplantation*. *J Card Surg*, 1997. **12**(5): p. 285-93.
30. Inverardi, L., et al., *Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues*. *Transplantation*, 1997. **63**(9): p. 1318-30.
31. Platt, J.L., et al., *Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model*. *Transplantation*, 1991. **52**(2): p. 214-20.

32. Schmoeckel, M., et al., *Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts*. Transplantation, 1996. **62**(6): p. 729-34.
33. Schmoeckel, M., et al., *Transgenic human decay accelerating factor makes normal pigs function as a concordant species*. J Heart Lung Transplant, 1997. **16**(7): p. 758-64.
34. Schmoeckel, M., et al., *Xenotransplantation of pig organs transgenic for human DAF: an update*. Transplant Proc, 1997. **29**(7): p. 3157-8.
35. White, D.J. and N. Yannoutsos, *Production of pigs transgenic for human DAF to overcome complement-mediated hyperacute xenograft rejection in man*. Res Immunol, 1996. **147**(2): p. 88-94.
36. Langford, G.A., et al., *Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor*. Transplant Proc, 1994. **26**(3): p. 1400-1.
37. Kuwaki, K., et al., *Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 29-31.
38. Yamada, K., et al., *Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 32-4.
39. Leventhal, J.R., et al., *The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model*. Transplantation, 1993. **56**(1): p. 1-8.
40. Bach, F.H., et al., *Barriers to xenotransplantation*. Nat Med, 1995. **1**(9): p. 869-73.
41. Rieben, R. and J.D. Seebach, *Xenograft rejection: IgG1, complement and NK cells team up to activate and destroy the endothelium*. Trends Immunol, 2005. **26**(1): p. 2-5.
42. Sykes, M., *Immunobiology of transplantation*. Faseb J, 1996. **10**(7): p. 721-30.

43. Leventhal, J.R., et al., *Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoadsorption. Results of in vitro and in vivo studies.* Transplantation, 1995. **59**(2): p. 294-300.
44. Sayegh, M.H. and L.A. Turka, *The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection.* N Engl J Med, 1998. **338**(25): p. 1813-21.
45. Yan, Y., et al., *Effects of a short course of leflunomide on T-independent B-lymphocyte xenoreactivity and on susceptibility of xenografts to acute or chronic rejection.* Transplantation, 2005. **79**(2): p. 135-41; discussion 133-4.
46. Lin, Y., M. Vandeputte, and M. Waer, *Effect of leflunomide and cyclosporine on the occurrence of chronic xenograft lesions.* Kidney Int Suppl, 1995. **52**: p. S23-8.
47. Akyürek, L.M., et al., *Tolerance induction ameliorates allograft vasculopathy in rat aortic transplants. Influence of Fas-mediated apoptosis.* J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2889-99.
48. Lanza, R.P., D.K. Cooper, and W.L. Chick, *Xenotransplantation.* Sci Am, 1997. **277**(1): p. 54-9.
49. Wells, D.L., et al., *Swine influenza virus infections. Transmission from ill pigs to humans at a Wisconsin agricultural fair and subsequent probable person-to-person transmission.* Jama, 1991. **265**(4): p. 478-81.
50. Chua, K.B., *Nipah virus outbreak in Malaysia.* J Clin Virol, 2003. **26**(3): p. 265-75.
51. Onions, D., et al., *An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation.* Xenotransplantation, 2000. **7**(2): p. 143-55.
52. Ericsson, T.A., et al., *Identification of receptors for pig endogenous retrovirus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6759-64.

53. Chiang, C.Y., et al., *Characterization of a monoclonal antibody specific to the Gag protein of porcine endogenous retrovirus and its application in detecting the virus infection*. Virus Res, 2005. **108**(1-2): p. 139-48.
54. Takeuchi, Y., et al., *Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9986-91.
55. Patience, C., Y. Takeuchi, and R.A. Weiss, *Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs*. Nat Med, 1997. **3**(3): p. 282-6.
56. Le Tissier, P., et al., *Two sets of human-tropic pig retrovirus*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 681-2.
57. Paradis, K., et al., *Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group*. Science, 1999. **285**(5431): p. 1236-41.
58. Tacke, S.J., et al., *Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation*. Xenotransplantation, 2001. **8**(2): p. 125-35.
59. Tacke, S.J., R. Kurth, and J. Denner, *Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation?* Virology, 2000. **268**(1): p. 87-93.
60. Lu, Q., et al., *The screening and identification of endogenous retrovirus free CEMPs*. Sci China C Life Sci, 2004. **47**(6): p. 562-6.
61. Platt, J.L., *Zoonosis in xenotransplantation*. Transplant Proc, 2000. **32**(7): p. 1551.
62. Takeuchi, Y., *Risk of zoonosis in xenotransplantation*. Transplant Proc, 2000. **32**(8): p. 2698-700.

63. Beckmann, J.P., *Xenotransplantation von Zellen, Geweben oder Organen*. 1 ed, ed. C.F. Gethmann. Vol. 8. 2000, Berlin; Heidelberg; New York: Springer Verlag.
64. Platt, J.L., *Physiologic barriers to xenotransplantation*. *Transplant Proc*, 2000. **32**(7): p. 1547-8.
65. Horslen, S.P., et al., *Extracorporeal liver perfusion using human and pig livers for acute liver failure*. *Transplantation*, 2000. **70**(10): p. 1472-8.
66. Ramirez, P., et al., *Life-supporting human complement regulator decay accelerating factor transgenic pig liver xenograft maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days*. *Transplantation*, 2000. **70**(7): p. 989-98.
67. Cozzi, E., et al., *Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts*. *Transplantation*, 2000. **70**(1): p. 15-21.
68. Cooper, D.K., et al., *Report of the Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society for Heart and Lung Transplantation: the present status of xenotransplantation and its potential role in the treatment of end-stage cardiac and pulmonary diseases*. *J Heart Lung Transplant*, 2000. **19**(12): p. 1125-65.
69. Daggett, C.W., et al., *Total respiratory support from swine lungs in primate recipients*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998. **115**(1): p. 19-27.
70. Schulte Am Esch, J., 2nd, et al., *O-linked glycosylation and functional incompatibility of porcine von Willebrand factor for human platelet GPIIb receptors*. *Xenotransplantation*, 2005. **12**(1): p. 30-7.
71. Tran, H.M., et al., *Distinct mechanisms for the induction and maintenance of allograft tolerance with CTLA4-Fc treatment*. *J Immunol*, 1997. **159**(5): p. 2232-9.
72. Seino, K., et al., *Inhibition of CD95 ligand-mediated inflammation*. *Transplant Proc*, 2000. **32**(7): p. 2038-9.

73. George, J.F., et al., *An essential role for Fas ligand in transplantation tolerance induced by donor bone marrow*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 333-5.
74. Khan, A., et al., *Discordant xenogeneic neonatal thymic transplantation can induce donor-specific tolerance*. Transplantation, 1997. **63**(1): p. 124-31.
75. Barth, R.N., et al., *Xenogeneic thymokidney and thymic tissue transplantation in a pig-to-baboon model: I. Evidence for pig-specific T-cell unresponsiveness*. Transplantation, 2003. **75**(10): p. 1615-24.
76. Vriens, P.W., et al., *Pre-transplant blood transfusion and cyclosporin A induce long-term hamster cardiac xenograft survival in immunocompetent rats*. Xenotransplantation, 2005. **12**(1): p. 63-71.
77. Kabelitz, D., *Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance*. Transplantation, 1998. **65**(7): p. 869-75.
78. Ryan, J.M., et al., *Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection*. J Inflamm (Lond), 2005. **2**: p. 8.
79. Suda, T. and S. Nagata, *Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 873-9.
80. Leite-de-Moraes, M.C., et al., *Fas/Fas ligand interactions promote activation-induced cell death of NK T lymphocytes*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4367-71.
81. Griffith, T.S., et al., *Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege*. Science, 1995. **270**(5239): p. 1189-92.
82. Berthou, C., et al., *Acquisition of granzyme B and Fas ligand proteins by human keratinocytes contributes to epidermal cell defense*. J Immunol, 1997. **159**(11): p. 5293-300.

83. Sata, M. and K. Walsh, *TNF α regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation*. Nat Med, 1998. **4**(4): p. 415-20.
84. O'Connell, J., et al., *The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege*. Immunol Today, 1999. **20**(1): p. 46-52.
85. Houston, A., et al., *Fas ligand mediates immune privilege and not inflammation in human colon cancer, irrespective of TGF- β expression*. Br J Cancer, 2003. **89**(7): p. 1345-51.
86. Contreras, D.N., et al., *Cervical cancer cells induce apoptosis of cytotoxic T lymphocytes*. J Immunother, 2000. **23**(1): p. 67-74.
87. Sprick, M.R., et al., *Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8*. Embo J, 2002. **21**(17): p. 4520-30.
88. Algeciras-Schimmich, A., et al., *Molecular ordering of the initial signaling events of CD95*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(1): p. 207-20.
89. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
90. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
91. Lynch, D.H., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses*. Immunol Today, 1995. **16**(12): p. 569-74.
92. Kang, S.M., et al., *Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 738-43.

93. Strasser, A. and L. O'Connor, *Fas ligand--caught between Scylla and Charybdis*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 21-2.
94. Miwa, K., et al., *Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1287-92.
95. Hohlbaum, A.M., S. Moe, and A. Marshak-Rothstein, *Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival*. J Exp Med, 2000. **191**(7): p. 1209-20.
96. Yamaoka-Tojo, M., et al., *Dual response to Fas ligation in human endothelial cells: apoptosis and induction of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1*. Coron Artery Dis, 2003. **14**(1): p. 89-94.
97. Curtin, J.F. and T.G. Cotter, *Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis*. Cell Signal, 2003. **15**(11): p. 983-92.
98. Tanaka, M., et al., *Downregulation of Fas ligand by shedding*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 31-6.
99. Rochat-Steiner, V., et al., *FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation*. J Exp Med, 2000. **192**(8): p. 1165-74.
100. Leroy, I., et al., *Protein kinase C zeta associates with death inducing signaling complex and regulates Fas ligand-induced apoptosis*. Cell Signal, 2005. **17**(9): p. 1149-57.
101. Siegmund, D., et al., *Death receptor-induced signaling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(15): p. 6363-79.
102. Bai, L., et al., *Expression of Fas but not Fas ligand on fetal pig beta cells*. Xenotransplantation, 2004. **11**(5): p. 426-35.

103. Kurenova, E., et al., *Focal adhesion kinase suppresses apoptosis by binding to the death domain of receptor-interacting protein*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4361-71.
104. Boehrer, S., et al., *Daxx overexpression in T-lymphoblastic Jurkat cells enhances caspase-dependent death receptor- and drug-induced apoptosis in distinct ways*. Cell Signal, 2005. **17**(5): p. 581-95.
105. Abreu-Martin, M.T., et al., *Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen*. J Immunol, 1995. **155**(9): p. 4147-54.
106. Takeuchi, T., et al., *Accelerated rejection of Fas ligand-expressing heart grafts*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 518-22.
107. Buonocore, S., et al., *Dendritic cells overexpressing CD95 (Fas) ligand elicit vigorous allospecific T-cell responses in vivo*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1469-76.
108. Stuart, P.M., et al., *CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival*. J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 396-402.
109. Lau, H.T., et al., *Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice*. Science, 1996. **273**(5271): p. 109-12.
110. Seino, K., et al., *Antitumor effect of locally produced CD95 ligand*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 165-70.
111. Askenasy, N., et al., *Display of Fas ligand protein on cardiac vasculature as a novel means of regulating allograft rejection*. Circulation, 2003. **107**(11): p. 1525-31.
112. Umemura, M., et al., *Involvement of IL-17 in Fas ligand-induced inflammation*. Int Immunol, 2004. **16**(8): p. 1099-108.

113. Chen, J.J., Y. Sun, and G.J. Nabel, *Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L)*. Science, 1998. **282**(5394): p. 1714-7.
114. Russell, J.H., *Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(3): p. 382-8.
115. Janeway C. A., T.P., *Immunologie*. 2. Auflage ed. 1997, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
116. Lu, L., et al., *Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation*. J Immunol, 1997. **158**(12): p. 5676-84.
117. Maher, S.E., et al., *Porcine endothelial CD86 is a major costimulator of xenogeneic human T cells: cloning, sequencing, and functional expression in human endothelial cells*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 3838-44.
118. Fyfe, A.I., et al., *Biologic modification of the immune response in mouse cardiac isografts using gene transfer*. J Heart Lung Transplant, 1995. **14**(6 Pt 2): p. S165-70.
119. Davis, T.A., et al., *Primary porcine endothelial cells express membrane-bound B7-2 (CD86) and a soluble factor that co-stimulate cyclosporin A-resistant and CD28-dependent human T cell proliferation*. Int Immunol, 1996. **8**(7): p. 1099-111.
120. Villunger, A., et al., *Constitutive expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand on multiple myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance*. Blood, 1997. **90**(1): p. 12-20.
121. Nishimura, A., et al., *A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(20): p. 6169.
122. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.

123. Vogelstein, B. and D. Gillespie, *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(2): p. 615-9.
124. Kayagaki, N., et al., *Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand*. J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1777-83.
125. Matzinger, P., *The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death*. J Immunol Methods, 1991. **145**(1-2): p. 185-92.
126. Böhm, C., et al., *A modification of the JAM test is necessary for a correct determination of apoptosis induced by FasL+ adherent tumor cells*. J Immunol Methods, 1998. **217**(1-2): p. 71-8.
127. Koester, S.K., et al., *Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7*. Cytometry, 1997. **29**(4): p. 306-12.
128. Bussing, A., et al., *Expression of mitochondrial Apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins*. Cytometry, 1999. **37**(2): p. 133-9.
129. Koester, S.K., et al., *APO2.7 defines a shared apoptotic-necrotic pathway in a breast tumor hypoxia model*. Cytometry, 1998. **33**(3): p. 324-32.
130. Yi, S., et al., *CD4+ cells play a major role in xenogeneic human anti-pig cytotoxicity through the Fas/Fas ligand lytic pathway*. Transplantation, 1999. **67**(3): p. 435-43.
131. Tsuyuki, S., M. Kono, and E.T. Bloom, *Cloning and potential utility of porcine Fas ligand: overexpression in porcine endothelial cells protects them from attack by human cytolytic cells*. Xenotransplantation, 2002. **9**(6): p. 410-21.

132. Bossi, G. and G.M. Griffiths, *Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells*. Nat Med, 1999. **5**(1): p. 90-6.
133. Bouchet, D., et al., *Differential sensitivity of endothelial cells of various species to apoptosis induced by gene transfer of Fas ligand: role of FLIP levels*. Mol Med, 2002. **8**(10): p. 612-23.
134. Motegi-Ishiyama, Y., et al., *Porcine Fas-ligand gene: genomic sequence analysis and comparison with human gene*. Mol Immunol, 2002. **38**(8): p. 581-6.
135. Muneta, Y., et al., *Molecular cloning, characterization, and expression of porcine Fas ligand (CD95 ligand)*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(5): p. 305-12.
136. Tran, T.H., et al., *Regulated and endothelial cell-specific expression of Fas ligand: an in vitro model for a strategy aiming at inhibiting xenograft rejection*. Transplantation, 1998. **66**(9): p. 1126-31.
137. Duke, R.C., et al., *Transplantation of cells and tissues expressing Fas ligand*. Transplant Proc, 1999. **31**(3): p. 1479-81.
138. Sata, M. and K. Walsh, *Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis*. J Clin Invest, 1998. **102**(9): p. 1682-9.
139. Matter-Reissmann, U.B., et al., *Human Fas-ligand expression on porcine endothelial cells does not protect against xenogeneic natural killer cytotoxicity*. Xenotransplantation, 2004. **11**(1): p. 43-52.
140. Krotz, F., et al., *Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells*. J Vasc Res, 2003. **40**(5): p. 425-34.

141. Murray, A.G., et al., *Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28*. *Immunity*, 1994. **1**(1): p. 57-63.

142. Xu, X.C., et al., *Allele-specific and peptide-dependent recognition of swine leukocyte antigen class I by human cytotoxic T-cell clones*. *Transplantation*, 1999. **68**(4): p. 473-9.

6 Abkürzungen

AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle (Antigen Presenting Cell)
ATCC	American Tissue Culture Collection
B7-1	CD80
B7-2	CD86
BAEC	Bovine Aortic Endothelial Cell
Bq	Becquerel
°C	Grad Celsius
CD	Zelloberflächenmarker (Cluster of Differentiation)
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde)
DAF	Decay Accelerating Factor
DAXX	Death Associated Protein-6
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Di-Methyl-Sulf-Oxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribo-Nucleic Acid)
DR4	Death Receptor 4
DR5	Death Receptor 5
E	Effektor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
FACS	fluoreszenzaktivierte Zelltrennung (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FADD	Fas Associated Death Domain
Fas	CD95
FasL	CD95 Ligand
FcgammaRIII	CD16
FCS	Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
FLICE	FADD-Like Interleukin-1 Beta-Converting Enzyme
FLIP	FLICE Inhibitory Protein
g	Gramm

GFP	Green Fluorescence Protein
h	human
HAEC	Human Aortic Endothelial Cell
HEPES	N-(2-Hydroxy-Ethyl)-Piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
HIPK3/FIST	Homeodomain-Interacting Protein Kinase 3/FADD Interacting Serine/Threonine Kinase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
m	Meter
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMPI	Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor
mol	Mol
MSP	Monozytenstimulierendes Protein
mW	Milliwatt
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle (Nuclear Killer Cell)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OxLDL	Oxidized low density lipoprotein
p	porcine
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Phosphate Buffer Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PE Cy5	Phycoerythrin Cy 5
PE	Phycoerythrin
PEC	Porcine Aortic Endothelial Cell
PERV	Porcine Endogenous Retro Virus

PH	Pleckstrin-Homologie
PKC	Protein Kinase C
RIP	Receptor Interacting Protein
RNA	Ribonukleinsäure (Ribo-Nucleic Acid)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SCID	Severe Combined Immuno-Deficiency
T	Target
TCR	T-Zell-Rezeptor (T Cell Receptor)
TNF	Tumor Nekrose Faktor (Tumor Necrosis Factor)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
vWF	von Willebrand Faktor
λ	Wellenlänge
x g	x-fache Erdbeschleunigung

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Genzentrums, allen Kolleginnen und Kollegen, die während meiner Doktorarbeit mit mir kooperierten und mich bei meiner Arbeit unterstützten.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Hallek für die Vergabe des interessanten Themas und Herrn Dr. Ulrich Hacker für die hilfreiche Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Winnacker und Herrn Prof. Dr. Grosschedl danke ich für die Leitung des Genzentrums und die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern ohne deren Unterstützung mein Studium und die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herzlich möchte ich meinen Freunden Christine, Henning, Malte, Ralf und Judith für die wertvollen Tips und Anregungen während der schriftlichen Erstellung der vorliegenden Arbeit danken.

Lebenslauf

persönliche Daten

Name: Caroline Rattenhuber
Anschrift: Heimstättenstr. 6, 80805 München
Geburtsdatum: 26.08.1974
Geburtsort: Starnberg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schullaufbahn

1980-1984 Volksschule Dießen
1984-1993 Gymnasium Weilheim und Abitur

Studium und beruflicher Werdegang

1993-1994 Studium der Naturwissenschaften am Trinity College Dublin,
Abschluß als Junior Freshman
SS 1995 bis 11/2001 Studium der Humanmedizin an der LMU München
16.10.00-16.09.01: Praktisches Jahr (Chirurgie und Innere Medizin: G-H Pitié
Salpêtrière, Paris; Wahlfach HNO: Klinikum München-Großhadern)
15.11.2001 Drittes Staatsexamen
01.04.02-30.09.03: ÄiP: HNO-Universitätsklinik Freiburg
01.10.03-28.02.05: Assistenzärztin an der HNO-Universitätsklinik Freiburg
seit 01.03.2005 Assistenzärztin in der Abteilung für HNO, KH München Schwabing

Promotion

Doktorvater: Prof. Dr. med. M. Hallek, Genzentrum München

Projekt: Untersuchungen apoptoseinduzierender und costimulatorischer Signalwege im xenogenen System: Wechselwirkungen zwischen porcinen Endothelzellen und humanen Jurkat-Zellen

Kongressbeiträge

75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für HNO e. V. 2004

Genetische und molekularbiologische Analyse der Genorte für Otosklerose (OTSC1-3)

C. Rattenhuber, P. Lohnstein, K. Hecksteden, J. Schipper, R. Birkenhäger

HNO Information 2004; 11.31

76. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO e. V. 2005

Vanishing Bone Disease- eine *Mimikry* von Neurofibromatose 2 oder einer ausgedehnten Osteomyelitis der Schädelbasis?

C. Rattenhuber, R. Birkenhäger, C. P. Adler, M. Uhl, R. Laszig, G. Ridder, A. Aschendorff, J. Schipper

HNO Information 2005; 84