

Annette Wosnik
Dr. med.

DIE PROTEKTIVE FUNKTION DES HUMANEN KOMPLEMENTREGULATOR CD59 AUF XENOGENEM GEWEBE UNTERSUCHUNGEN AN EINEM ZELLKULTURMODELL FÜR DIE XENOTRANSPLANTATION VON SCHWEIN ZU MENSCH

Geboren am 11.01.1972
Reifeprüfung am 10.07.1991 in Bad Kissingen
Studiengang von SS 1992 bis WS 1999
Physikum am 15.03.1994 an der Universität Marburg
Klinisches Studium in Marburg/Heidelberg/Newcastle upon Tyne
Praktisches Jahr in Paris, Frankreich und Boston, USA
Staatsexamen am 03.12.1999

Promotionsfach Immunologie
Doktorvater Prof. Dr. Kirschfink

Die Komplementinhibition durch den Einsatz regulatorischer Moleküle bietet einen interessanten therapeutischen Ansatz in den verschiedensten klinischen und experimentellen Gebieten. Das Haupthindernis zur erfolgreichen Xenotransplantation stellt die hyperakute Abstoßung dar. Die Aktivierung der Komplementkaskade des Fremdorganempfängers ist an deren Pathogenese wesentlich beteiligt. Eine Strategie zur Verhinderung der hyperakuten Abstoßung ist die Expression von membranassoziierten Komplementregulatoren des Transplantatempfängers auf dem Donororgan, um so die zytotoxische Aktion des Komplementsystems zu unterdrücken.

Da das Schwein als möglicher Organspender diskutiert wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen in einem in-vitro Zellkulturmodell für die Schwein-Mensch Xenotransplantation durchgeführt. Für die Versuche wurden Schweineendothelzellen benutzt, da Endothelzellen die Zielzellen der hyperakuten Abstoßungsreaktion darstellen. Das humane Membranprotein CD59, das im homologen System die Komplementaktivierung auf der Ebene der Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) inhibiert, wurde auf seine protektive Funktion im xenogenen System untersucht.

Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichen Xenotransplantationsmodellen hatten zuvor gezeigt, dass die Expression von humanem CD59 die xenogenen Zellen gegenüber humaner Komplement-vermittelter Lyse zu schützen vermag. Für die Expression von hCD59 auf Schweineendothelzellen hingegen wurden diskrepante

Ergebnisse veröffentlicht. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in Vorarbeiten eine signifikante Protektion von Schweineendothelzellen, die mit hCD59 transfiziert waren, beobachten. Diese Ergebnisse wurden aus Versuchen mit einer Zellpopulation gewonnen, die bezüglich der hCD59 Expression sehr heterogen waren. Aus diesem Grund wurden hCD59-positive Zellklone mit unterschiedlichen Expressionsniveaus von hCD59 mit dem Grenzverdünnungsverfahren etabliert, um das Expressionsniveau von hCD59 auf den Schweineendothelzellen mit dem Grad der Protektion gegenüber Komplement-vermittelter Lyse zu korrelieren. Im Mittelpunkt stand dabei die Frage nach einer Schwellenexpression, die erforderlich ist, um eine ausreichende Protektion zu erzielen.

Von der mit hCD59 transfizierten Zelllinie wurden zehn Klone erhalten, bei denen eine Quantifizierung der exprimierten hCD59 Oberflächenmoleküle durchgeführt wurde. Das protektive Potential der verschiedenen Transfektanten wurde durch Inkubation mit normalem Humanserum als Quelle von natürlichem Antikörper und Komplement getestet. Die Empfindlichkeit gegenüber humanem Serum nahm mit steigender Expression des Komplementregulatorproteins ab. Dadurch konnte im Schwein-Mensch in-vitro Xenotransplantationsmodell erstmalig gezeigt werden, dass die effiziente Protektion der xenogenen Zellen eine definierte Anzahl von dem Komplementinhibitor hCD59 im Sinne einer Schwellenexpression, aber auch eine Überexpression im Vergleich zu der physiologischen Expression auf humanen Endothelzellen erfordert.

Die im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Zellkulturarbeiten im Schwein-Mensch in-vitro Modell stellten mit ähnlichen Arbeiten anderer Autoren einen wesentlichen Schritt zur daraufhin folgenden Herstellung transgener Tiere dar. Die darauf basierenden weiterführenden Arbeiten ermöglichten auch ein besseres Verständnis der verschiedenen Reaktionen im Rahmen der hyperakuten Abstoßung. Die zunächst rasante Entwicklung weiterer Xenotransplantationsstudien mit transgenen Tieren zeigte jedoch auch, dass die Komplementinhibition zur Vermeidung der hyperakuten Abstoßung möglicherweise nicht den entscheidenden Einfluss auf das Überleben und die Funktion des Fremdorganes hat, den man sich aufgrund der in-vitro Zellkulturarbeiten zunächst erhofft hatte.