

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik**

**der Universität Würzburg**

**(Chirurgie I)**

**Direktor: Prof. Dr. med. A. Thiede**

---

**Untersuchungen zur humoralen Immunantwort  
in Wistar Ratten nach xenogener Transplantation  
mikroverkapselter Langerhans-Inseln des Schweins**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Andreas Popel**

**aus Thiersheim**

**Würzburg, November 2004**

Referentin: Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs

Korreferent: Professor Dr. med. A. Thiede

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2005

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
3.1	Untersuchungsmaterial .....	7
3.1.1	Transplantation porziner Langerhans-Inseln .....	7
3.1.2	Transplantationsergebnis und daraus resultierende Einteilung der Versuchsgruppen für die vorliegende Arbeit .....	8
3.1.3	Materialgewinnung .....	10
3.1.3.1	Serum und Komplement aus Wistar Ratten .....	10
3.1.3.2	Humanes Pankreasgewebe .....	10
3.1.3.3	Rattengewebe.....	11
3.1.3.4	Porzines Gewebe .....	11
3.1.4	Anfertigen der Gefrierschnitte.....	11
3.2	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen .....	11
3.2.1	Indirekte Immunfluoreszenz.....	11
3.2.1.1	Sekundärantikörper.....	11
3.2.1.2	Durchführung der Färbung .....	12
3.2.1.3	Graduierung der Fluoreszenzintensität .....	12
3.2.1.4	Präinkubation der Seren.....	13
3.2.1.5	Präinkubation der Gefrierschnitte.....	13
3.2.2	Nachweis von SLA-I und SLA-II.....	13
3.2.3	Lektinfärbung zum Nachweis der Gal $\alpha$ -Epitope.....	14
3.2.4	Nachweis der klassischen und alternativen Komplementaktivierung <i>in vitro</i> .	14
3.2.5	Vitalitätsfärbung mit FDA/PI .....	14
3.2.6	Überprüfung der Alginatkapseln als natürliche Barriere für Antikörper .....	15
3.2.7	Auswertung und Darstellung der Ergebnisse .....	15

<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>16</b>
4.1	Natürliche und induzierte Antikörper gegen porcine Langerhans-Inseln im Serum von Wistar Ratten .....	16
4.2	Antikörper nach Transplantation mikroverkapselter porciner Langerhans- Inseln .....	16
4.3	Bestimmung der Antikörper-Isotypen nach Transplantation mikro- verkapselter porciner Langerhans-Inseln.....	20
4.4	Nachweis von Antikörpern gegen das Gal $\alpha$ -Epitop .....	22
4.5	Nachweis von Antikörpern gegen porcines Insulin.....	24
4.6	Nachweis von Antikörpern gegen SLA-I und SLA-II Moleküle .....	25
4.7	Spezies-Spezifität der Antikörper gegen pLI .....	27
4.8	Gewebe-Spezifität der Antikörper gegen porcine Langerhans-Inseln.....	28
4.9	Zeitlicher Verlauf der Antikörpertiter nach Transplantation mikrover- kapselter porciner Langerhans-Inseln.....	30
4.10	Zytotoxizität der Transplantat-induzierten Antikörper.....	32
4.10.1	Unverkapselte porcine Langerhans-Inseln .....	32
4.10.2	Mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln .....	33
4.11	Permeabilität der Mikrokapseln für IgG und IgM.....	34
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>49</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Abkürzungsverzeichnis

BZ	Blutzucker in mg/dl
CD	<i>cluster of differentiation</i>
FDA	Fluoreszeindiazetat
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
Gal	Galaktose
gal $\alpha$	Gal $\alpha$ -3Gal $\beta$ 1-4GlcNac-R (Kohlenhydrat-Epitop)
Anti-gal $\alpha$	Antikörper gegen gal $\alpha$
Glc	Glukose
IEQ	Inseläquivalent (Langerhans-Insel mit einem mittleren Durchmesser von 150 $\mu$ m)
IF	Indirekte Immunfluoreszenz
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
LI	Langerhans-Insel(n)
hLI	humane Langerhans-Insel(n)
LEW LI	Langerhans-Insel(n) der Lewis Ratte
pLI	porzine Langerhans-Insel(n)
mpLI	mikroverkapselte porzine Langerhans-Insel(n)
min	Minuten
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MHC-I	<i>major histocompatibility complex</i> Moleküle der Klasse I
MHC-II	<i>major histocompatibility complex</i> Moleküle der Klasse II
OT	Objektträger
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI	Propidiumjodid
RT	Raumtemperatur
SLA	<i>swine leukocyte antigen</i>
SLA-I	<i>swine leukocyte antigen</i> Moleküle der Klasse I
SLA-II	<i>swine leukocyte antigen</i> Moleküle der Klasse II
STZ	Streptozotozin
xITX	xenogene Inseltransplantation

# 1 Einleitung

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Krankheit des Kohlenhydratstoffwechsels, die auf einem absoluten oder relativen Insulinmangel beruht [1]. Das pathognomonische Symptom des Diabetes mellitus ist die Hyperglykämie. Die *American Diabetes Association* (1997) empfiehlt eine Einteilung unter ätiologischen Gesichtspunkten in vier Hauptgruppen mit Untergruppen (alphabetisch geordnet) [1,2]. Gruppe I beinhaltet den Typ 1 Diabetes, der mit immunologisch (A) oder idiopathisch (B) bedingter Betazelldestruktion einhergeht und in der Regel zu einem absoluten Insulinmangel führt. Zur Gruppe II wird der Typ 2 Diabetes gezählt, dessen primäre Ursachen eine Insulinresistenz und daraus resultierend ein relativer Insulinmangel sind. In der dritten Gruppe werden alle seltenen Ursachen des Diabetes mellitus, wie genetische Defekte der Betazellfunktion (A), genetische Defekte der Insulinwirkung (B), Erkrankungen des exokrinen Pankreas (C), Endokrinopathien (D), medikamentös oder toxisch induzierte Formen (E), Infektionen (F), seltene immunologische Diabetesformen (G) und weitere seltene Syndrome, die mit dem Diabetes mellitus assoziiert sind (H) zusammengefasst. Die Gruppe IV beinhaltet mit dem Gestationsdiabetes eine transiente Form des Diabetes mellitus. Eine neuere Klassifikation der WHO (1999) teilt nach dem klinischen Schweregrad und der daraus resultierenden Therapie ein [1-3]. Unterschieden werden Patienten mit gestörter Glukosetoleranz (*impaired glucose tolerance*, IGT), Patienten deren Diabetestherapie keine Insulingabe erfordert (*non-insulin requiring*, NIR), Patienten die orale Antidiabetika in Kombination mit Insulin zur Blutzuckerregulierung benötigen (*insulin requiring for control*, IRC, z.B. Typ 2-Diabetiker) und Diabetiker ohne eigene Insulinproduktion, die auf Fremdinsulin angewiesen sind (*insulin requiring for survival*, IRS, z.B. Typ 1-Diabetiker, aber auch Typ 2-Diabetiker).

Bei Diabetikern des IRS-Typs ist das Therapieziel die Normalisierung des Blutzuckerspiegels durch Zufuhr rekombinanter Insulinanaloga. Eingesetzt werden unterschiedlich lange wirkende Insuline, die in Kombination im so genannten Basis-Bolus-Prinzip bei der intensivierten Insulintherapie angewendet werden [2,4]. Hier soll die Basisgabe eines langwirksamen Insulins den ernährungsunabhängigen Tagesbedarf an Insulin abdecken, die Bolusgabe eines kurz wirksamen Insulins hingegen den zusätzlichen nahrungsabhängigen Bedarf decken [4]. Doch trotz täglich mehrfacher Blutzuckermessungen kommt es bei der intensivierten Insulintherapie immer wieder zu unkontrollierten Blutzuckerschwankungen mit massiven Blutzuckerspit-

zen. Diese hyperglykämischen Intervalle sind die Ursache für die problematischen Sekundärkomplikationen, wie Mikro- und Makroangiopathien [1,3,5-7], Retinopathie [5,8], Nephropathie [5], Neuropathien [2,5], gastrointestinale und urogenitale Dysfunktionen [2], höhere Infektanfälligkeit [1,2,5] und ein erhöhtes Thromboserisiko durch Erhöhung der Viskosität des Blutes [5], um nur die wesentlichen Komplikationen zu nennen. Eine Ursache für das Auftreten der Sekundärkomplikationen ist die nicht-enzymatische Glykosilierung von Proteinen infolge einer Hyperglykämie [9]. Je schlechter der Blutzucker eingestellt ist, desto häufiger und früher treten oben genannte Sekundärschäden auf [4,10]. Um das Problem der Blutzuckerschwankungen in den Griff zu bekommen, wurde nach alternativen Therapien zur exogenen Insulinzufuhr gesucht. Eine Alternative ist die Transplantation lebender, Insulinproduzierender Zellen, denn sie unterliegen der Steuerung durch körpereigene Regelkreise (die Insulingabe durch die Spritze nicht). Dabei muss die heterotope Pankreastransplantation genannt werden, die zeitgleich mit einer Nierentransplantation bei chronischem Nierenversagen erfolgreich durchgeführt wird [11]. Diese erfordert jedoch, wie jede allogene Transplantation, eine lebenslange immunsuppressive Therapie. Außerdem ist die Pankreastransplantation für den Patienten nicht bezüglich aller Spätkomplikationen Erfolg versprechend, denn bereits fortgeschrittene Retinopathien [12,13] oder eine bereits bestehende autonome Neuropathie kommen nur selten zum Stillstand, hingegen wird die Nephropathie der Spenderniere verhindert [12,13], und bei bestehender sensomotorischer Polyneuropathie zeigt sich teilweise sogar eine klinische Besserung [13]. Zusätzlich erfordert die Transplantation kompletter Organe einen großen und mit einem hohen Risiko für den Patienten behafteten chirurgischen Eingriff. Aus diesen Gründen scheidet die Pankreastransplantation als Therapie für den jungen, ansonsten gesunden IRS-Diabetiker aus.

Die Transplantation isolierter Langerhans-Inseln hat dem gegenüber deutliche Vorteile: Bei dieser Art der Zelltransplantation bedarf es nur eines minimal-invasiven chirurgischen Eingriffs und außerdem können die isolierten Inselzellen vor Transplantation so manipuliert werden, dass deren Immunogenität, z.B. durch verschiedene Kulturbedingungen *in vitro* [14-17] gesenkt wird. Weiterhin können sie durch Verkapselung mit biokompatiblen Materialien – diese dienen als immunologische Barriere – vom Immunsystem des Empfängers abgeschirmt werden [15,18-24]. Diese technischen und biologischen Vorteile wurden bereits an Tierexperimenten hinreichend belegt [25-27]; leider blieben die klinischen Erfolge weit hinter allen Erwartungen zurück. Von 1893 bis 2000 registrierte das Internationale Inseltransplantations-

register weltweit 493 allogene Inselzelltransplantationen bei Patienten mit einem Diabetes mellitus. Detaillierte Analysen zwischen 1990 und 1999 zeigen jedoch, dass nur 41% der Inselzelltransplantate länger als ein Jahr überlebten; und insgesamt betrachtet kamen aber nur 11% der Patienten länger als ein Jahr ohne exogene Insulinsubstitution aus [28].

In Deutschland geht man nach aktuellen Schätzungen davon aus, dass über 8% der Gesamtbevölkerung am Diabetes mellitus erkrankt sind, davon geschätzt etwa 5-7% am Diabetes mellitus Typ 1. Dies würde bedeuten, dass es derzeit in Deutschland etwa 400.000 Typ 1-Diabetiker gibt. Abhilfe für den Organmangel könnte die Transplantation von artfremdem, tierischem Insulin-produzierendem Gewebe schaffen. Erste Überlegungen dazu führten aufgrund der phylogenetischen Nähe zum Menschen zunächst zu Primaten. Gegen Primaten als Organspender sprechen jedoch die hohen Kosten für Züchtung und Haltung, die große Gefahr der Übertragung infektiöser Krankheiten, ethische Vorbehalte in der Gesellschaft und letztlich die Tatsache, dass viele Primaten in ihren natürlichen Lebensräumen vom Aussterben bedroht sind. Dagegen scheinen Nutztiere, wie Rind, Schaf und Schwein ideale Spendertiere für die Xenotransplantation zu sein. Insbesondere das Hausschwein als Allesfresser mit Organen, die in ihrer Anatomie, Größe und Funktion den Organen des menschlichen Organismus nahezu identisch sind, scheint das optimale Spendertier für die Xenotransplantation zu sein. Da bereits früher, vor der Herstellung rekombinanter humaner Insuline, porcines Insulin in der Diabetestherapie erfolgreich eingesetzt wurde, weiß man, dass porcines Insulin, produziert von den Spender-Inseln, für die meisten Diabetiker gut verträglich ist.

Will man im Tierexperiment die Xenotransplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln (mpLI) in diabetische Ratten als präklinisches Modell für die spätere klinische Anwendung etablieren, so ergeben sich eine Vielzahl von offenen Fragen, Problemen und Optimierungsansätzen. Die Probleme liegen einerseits immer noch in der Herstellung perfekter Inseltransplantate, andererseits in deren Akzeptanz bzw. Funktion in den Empfängertieren über einen längeren Zeitraum. Bei der Herstellung hat nach wie vor die Inselisolierung mittels eines Enzymgemisches die Schlüsselrolle für das Gelingen optimaler Inseltransplantate. Seit die Inselisolierung 1967 erstmalig durchgeführt wurde [29], wurde sie stetig methodisch-technisch weiterentwickelt, und seit der partiellen Automatisierung der Verdauungs-Filtrations-Methode durch C. Ricordi [30-32] ist sie das Standardverfahren zur erfolgreichen Isolierung sowohl aus humanen Spendern [33-36], als auch aus Säugetieren [37], insbesonde-



re aus Nagern [38], aber zunehmend auch aus dem Schwein [39-50]; speziell in dieser Spezies ist sie aber noch lange kein Routineverfahren, obwohl unser Labor die Isolierungstechnik speziell aus porcinen Pankreata in den letzten Jahren intensiv weiter verfolgt hat und hier eindrucksvolle Erfolge vorweisen konnte, so etwa sehr erfolgreiche Isolierungen aus jungen Spendertieren [51]. Der nächste Schritt hin zum perfekten Inseltransplantat ist die Aufreinigung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation, wodurch das endokrine Gewebe niedriger Dichte vom exokrinen Gewebe höherer Dichte getrennt wird [52]. Das endokrine Gewebe soll im Idealfall nach Aufreinigung eine Reinheit von 100% aufweisen, denn durch exokrine Verunreinigungen könnte es infolge einer höheren Immunogenität des exokrinen Zellkompartiments zu einer verstärkten Immunantwort kommen [53]. Nach 24-stündiger *In-vitro*-Kultur erfolgt die mechanische Mikroverkapselung mit Barium-Alginat. Vor der Freigabe der mikroverkapselten porcinen Langerhans-Inseln zur Transplantation, wird deren Vitalität mittels Fluoreszein-Diazetat/Propidiumjod-Färbung gemessen [54], sowie ihre Funktion *in vitro* anhand der dynamischen Insulinsekretion nach Glukosereiz [55]. Doch trotz der Tatsache, dass weitestgehend reine, vitale und optimal verkapselte Inseln in diabetische Ratten transplantiert wurden, zeigte sich in den transplantierten Wistar Ratten eine sehr unterschiedliche Akzeptanz mit unterschiedlich langer Funktion der mpLI [56].

Es ist möglich, dass eine mangelhafte Sauerstoff- oder Nährstoffversorgung zu einem frühzeitigen Transplantatversagen führen [57-59], doch scheint es wahrscheinlicher, dass für das Transplantatversagen eine unspezifische und/oder spezifische Immunreaktion des Empfängers verantwortlich ist – trotz, auf den ersten Blick, erfolgreicher Immunsolation des Gewebes mit dem Barium-Alginat. Aus Jahrzehnte langen Untersuchungen ist bekannt, dass Abstoßungsreaktionen nach Transplantation unterschiedlich ablaufen können. Man unterscheidet die hyperakute Abstoßung von der akuten und der chronischen Abstoßung. Die hyperakute Abstoßung wird ausschließlich bei der Transplantation vaskularisierter xenogener Organe beobachtet. Sie wird durch natürliche xenoreaktive Antikörper [60-64], die bereits vor Transplantation im Empfängerserum nachweisbar sind, ausgelöst. Diese binden innerhalb weniger Minuten an die Endothelzellen des xenogenen Spenderorgans und aktivieren so die Komplement- und Gerinnungskaskade [60,65]. Deshalb scheint die Xenotransplantation vollständiger, vaskularisierter Organe in naher Zukunft auch nicht möglich zu sein. Die akute Abstoßung xenogener Organe wird ebenfalls durch zytotoxische Antikörper gegen Endothelzellen induziert [65]; nur handelt es sich hierbei nicht um Antikörper, die bereits vor Transplantation existierten (so

genannte natürliche oder präformierte), sondern um Antikörper, deren Produktion auf die direkte oder indirekte Antigenpräsentation nach Transplantation zurückzuführen ist. Deshalb verläuft die akute Abstoßung deutlich langsamer als die hyperakute (Stunden bis Tage nach Transplantation) [60,65]. Die chronische Abstoßungsreaktion verläuft hingegen über Monate oder auch Jahre. Doch genaue Untersuchungen der chronischen Abstoßung nach Xenotransplantation liegen noch nicht vor, da bislang keine ausreichende Langzeitfunktion nach Xenotransplantation beobachtet werden konnte; bisher geht man jedoch davon aus, dass die chronische Abstoßung nach Xenotransplantation grundsätzlich ähnlich verläuft, wie jene nach Allotransplantation.

Untersuchungen von Korsgren et al. bestätigen, dass 12 Tage nach Transplantation unverkapselter fetaler porziner Inselzellcluster (ICC) in Lew Ratten IgG Antikörper gegen ICC gebildet wurden [65]. Die Situation nach Verkapselung der pLI scheint jedoch andersartig zu sein, wenn auch nach Auffassung von R. G. Gill die Verkapselung nur eine Zellisolierung darstellen kann. Eine vollständige Immunsolation sei demnach gar nicht möglich, da immer Spenderantigene durch die Kapseln frei hindurch diffundieren könnten [59]. Ob es über den Weg der indirekten T-Zellaktivierung (und T-Zell-Hilfe) zu einer Antikörperbildung gegen das Transplantat kommt, ist noch ungeklärt. Selbst wenn es zur Antikörperbildung käme, bliebe die Frage offen, ob Antikörper und die entscheidenden Komplementfaktoren durch die „Poren“ der Barium-Mikrokapseln hindurch diffundieren und die Zerstörung der Betazellen herbei führen können.

Hier setzt die vorliegende Arbeit an und befasst sich mit Untersuchungen zur humoralen Immunantwort von Wistar Ratten nach xenogener Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln. Dabei wurden u.a. die Seren transplantiertter Ratten immunhistochemisch analysiert, um so die Ursachen für einen frühen Transplantatverlust zu erklären. Weiterhin wurden in *In-vitro*-Tests die Eigenschaften der Barium-Alginat-Kapseln hinsichtlich ihrer Barrierefunktion gegenüber den pLI getestet. In diesem gedanklichen Zusammenhang sollten folgende Fragen beantwortet werden:

## 2 Fragestellung

1. Welche Antikörpertiter werden nach xenogener Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln in nicht immunsupprimierten Ratten beobachtet? Welcher Immunglobulinklasse gehören die Antikörper an, und richten sie sich gegen die xenogenen Inselzellen und/oder das Alginat, das zur Mikroverkapselung verwendet wird?
2. Welchem Isotyp lassen sich die Antikörper zuordnen?
3. An welche Epitope binden die Antikörper? Handelt es sich bei ihnen um Antikörper gegen das Gal $\alpha$  Epitop und/oder das porcine Insulin? Oder handelt es sich um Antikörper gegen SLA-I und/oder SLA-II?
4. Ist das Bindungsverhalten der Antikörper Spezies- und/oder Gewebes-pezifisch?
5. Wie ist der zeitliche Verlauf der Antikörpertiter? Korrelieren diese ggf. mit der Transplantatfunktion, d.h. der *kurzfristigen* oder der *langfristigen* Transplantatfunktion, bzw. einer Transplantatdysfunktion?
6. Aktivieren die gegen die xenogenen Inselzellen gerichteten Antikörper Komplement und können sie unverkapselte porcine Inselzellen lysieren?
7. Bieten die Mikrokapseln aus Barium-Alginat eine komplette Barriere gegen Antikörper? Sofern Antikörper ins Innere der Mikrokapseln gelangen, vermögen sie dann, zusammen mit dem Komplement der Wistar Ratten, die xenogenen Inselzellen im Innern der Mikrokapseln zu zerstören?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungsmaterial**

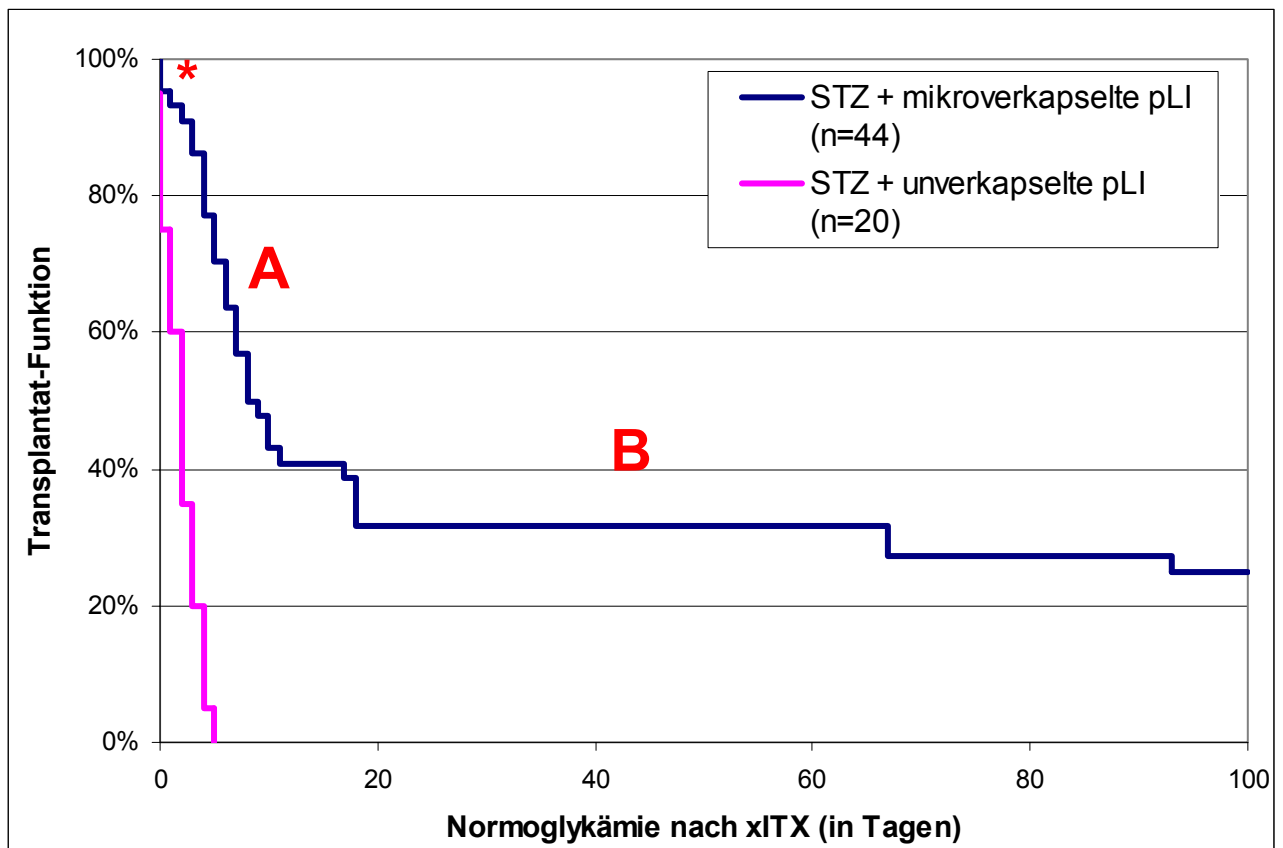
Das in dieser Arbeit verwendete Untersuchungsmaterial stammt aus Wistar Ratten, die mikroverkapselte porzine Langerhans-Inseln zur Therapie eines mit Streptozotozin (STZ; Fa. CellConcepts GmbH; Umkirch) medikamentös induzierten Diabetes erhalten hatten. Die Etablierung dieser Transplantationsform im Modell *Ratte-gegen-Schwein*, ebenso wie funktionelle und histologische Untersuchungen, sind Gegenstand weiterer medizinischer Doktorarbeiten und werden hier nur dann behandelt, wenn sie für das Verständnis dieser Arbeit unbedingt erforderlich sind.

##### **3.1.1 Transplantation porziner Langerhans-Inseln**

Porzine Spenderpankreatata wurden im Rahmen des Schlachtvorganges gewonnen (Fa. Hollerbach; Rimpar). Nach ca. 20min warmer Ischämie wurden die Pankreatata in RPMI 1640 (Fa. CellConcepts GmbH) Medium eisgekühlt ins Labor transportiert; dort wurden Fett, Gefäße und Bindegewebe abpräpariert. Anschließend wurden die porzinen Langerhans-Inseln halbautomatisch unter Verwendung des Enzyms Liberase<sup>TM</sup>PI (Fa. Roche; Indianapolis, USA) aus dem Gewebeverband isoliert [30-32]. Die pLI wurden im COBE Cell Processor 2991 (COBE BCT, Inc.; Lakewood, USA) angereichert (>90%), sodann für 2 Tage in komplettem HAM's F12 (Fa. CellConcepts GmbH) Medium kultiviert, bevor sie mit hochreinem Bariumalginat (Fa. Pronova; Oslo, Norwegen) mikroverkapselt (mpLI) und erneut für 24h in HAM's F12 Medium kultiviert wurden. Die Transplantation der mpLI erfolgte in die freie Bauchhöhle (ca. 2/3 des Transplantates) und unter die linke Nierenkapsel (ca. 1/3 des Transplantates) STZ-diabetischer Wistar Ratten. Insgesamt wurden 15.000-20.000 Mikro kapseln mit 5-8 Inseläquivalenten(IEQ)/Kapsel transplantiert. Ein IEQ entspricht einer mittelgroßen pLI mit einem Durchmesser von 150µm. Zur Kontrolle wurden unverkapselte pLI und leere Mikro kapseln transplantiert bzw. implantiert. Die Wistar Ratten wurden mindestens 4 Tage vor Transplantation mit STZ, einem Betazellgift, diabetisch gemacht (55mg STZ/kg Körpergewicht i.v.). Der Diabetes wurde täglich über die Blutzuckerwerte bestimmt. Die Mikroverkapselung der pLI erfolgte nach einem im hiesigen Labor etablierten Standardverfahren [66]. Blutzuckermessungen erfolgten nach Transplantation in der ersten Woche täglich, danach 2x wöchentlich.

### 3.1.2 Transplantationsergebnis und daraus resultierende Einteilung der Versuchsgruppen für die vorliegende Arbeit

Abbildung 1 zeigt das Ergebnis von insgesamt 64 erfolgreichen Transplantationen, davon 20 mit unverkapselten pLI, deren Funktion spätestens am Tag +5 versagte, und 44 mit mikroverkapselten pLI, die zum Teil nur kurze Zeit, d.h. bis zum 20. postoperativen Tag, Normoglykämie in den ehemals diabetischen Empfängern induzierten (*Kurzzeitfunktion*), oder aber deutlich darüber hinaus (*Langzeitfunktion*) funktionierten.

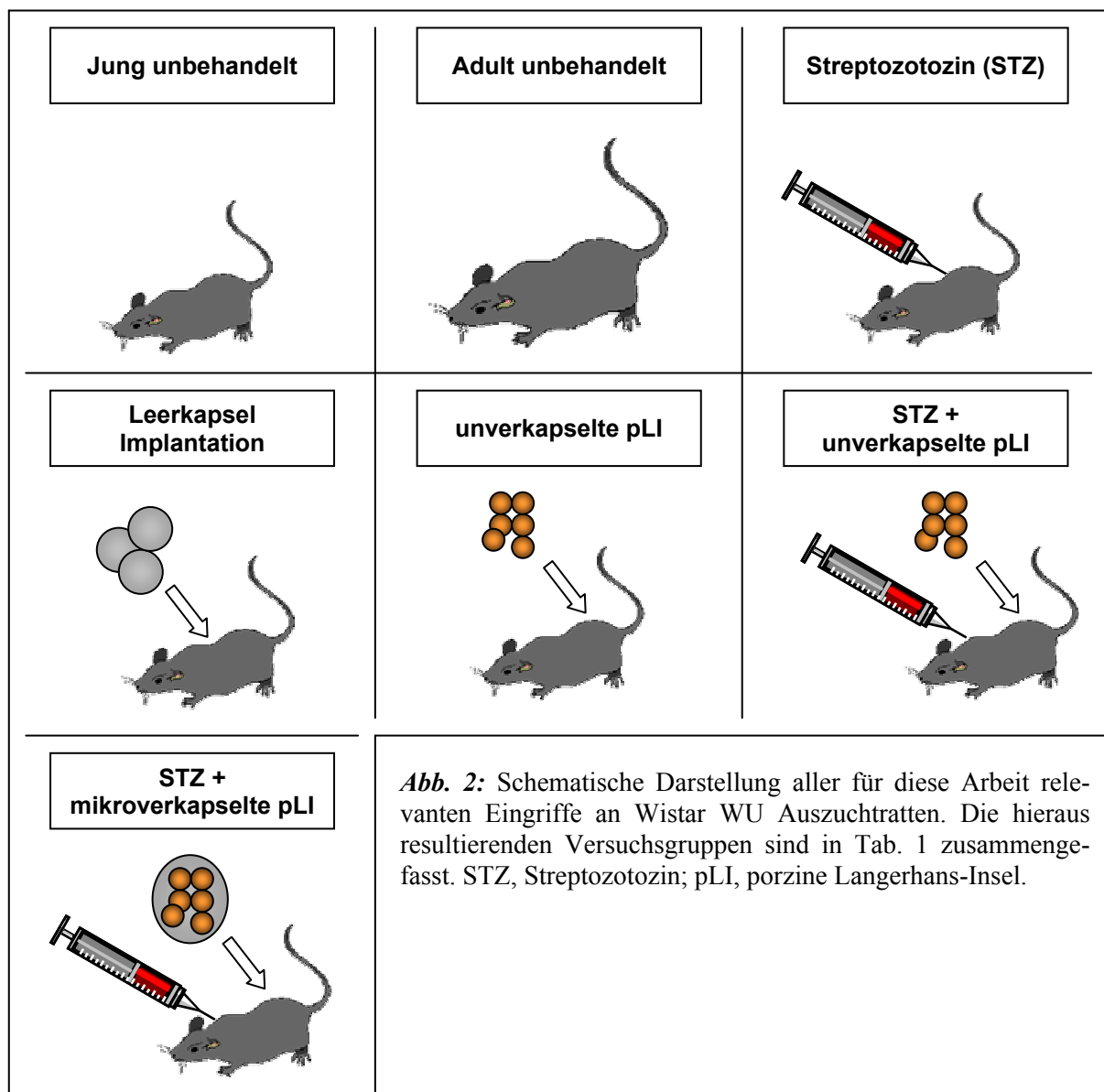


**Abb. 1:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier: Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln (mpLI) in STZ-diabetischen Wistar Ratten ohne Immunsuppression. *Blaue Kurve:* Funktion von mpLI in STZ-diabetischen Wistar Ratten: (A) Transplantate mit *Kurzzeitfunktion* (n=26), (B) Transplantate mit *Langzeitfunktion* (n=14); (\*) Transplantate, die weniger als 48h funktionierten (n=4); *Lila Kurve:* Funktion unverkapselter pLI in STZ-diabetischen Wistar Ratten (Kontrollgruppe; n=20).

Die zu untersuchenden Seren (Gewinnung, Aufbereitung, Lagerung s.u.) wurden je nach Transplantationsergebnis, d.h. der Dauer der Normoglykämie nach xenogener Inselzell-Transplantation (xITX), die im Bereich von 80-150mg/dl liegt, klassifiziert. In der Gruppe *Kurzzeitfunktion* werden Seren von Tieren geführt, die nach Transplantation von mpLI 2-20 Tage normoglykämisch waren, dann aber wieder hyperglykämisch wurden. In der Gruppe *Langzeitfunktion* werden die Seren geführt, deren Spender länger als 20 Tage nach xITX normoglykämisch waren. Seren von Tieren mit primärer Transplantat-Nichtfunktion (keine

Funktion oder Funktionsverlust innerhalb von 48h) wurden nicht untersucht. Es kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass das Versagen dieser Transplantate auch auf perioperative Komplikationen zurückzuführen ist.

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Ratten und prinzipiellen Eingriffe, die an diesen im Rahmen des von der Regierung von Unterfranken genehmigten Tierversuchsvorhabens vorgenommen wurden. In Tab. 1 sind alle Versuchsgruppen, die aus diesen Eingriffen resultieren, der besseren Übersicht halber noch einmal zusammengefasst. Es wurden nicht alle Individuen der in Abb. 1 dargestellten Tiere untersucht; die Auswahl der Tiere mit *Kurzzeitfunktion* (A) und *Langzeitfunktion* (B) (vgl. Abb. 1) erfolgte zufällig.



**Tabelle 1.** Übersicht über die Versuchsgruppen, deren Seren in dieser Arbeit verwendet wurden.

Versuchsgruppe	Alter der Wistar Ratten	Anzahl [n]	Behandlung und Transplantation	Funktionsdauer der Transplantate [Tage]	Zeitpunkt der Serum-entnahme
Jung unbehandelt	2-3 Monate	3	-----	-----	5.-15. Tag nach xITX
Streptozotolin (STZ)		3	STZ	-----	
Leerkapsel Implantation		3	Leer	-----	
STZ + unverkapselte pLI		3	STZ + pLI	n. n.	
Kurzzeitfunktion		7	STZ + mpLI	2-20	
Langzeitfunktion		4		>20-405	
Adult unbehandelt	0,5-1,5 Jahre	3	-----	-----	ab 20. Tag nach xITX
Sensibilisierung		3	pLI	n.n	
Langzeitfunktion		4	STZ + mpLI	>20-405	

Erklärung: STZ, STZ-diabetisch; Leer, Leerkapseln; pLI, unverkapselte porzine LI; mpLI, mikroverkapselte pLI; n. n., nicht nachvollziehbar; xITX, xenogene Inselzell-Transplantation.

Kontrollseren stammten von jungen und alten unbehandelten Wistar Ratten, jungen und alten Wistar Ratten, die einmal unverkapselte pLI erhalten hatten (Transplantat-relevante Positivkontrolle) oder 3x in wöchentlichen Abständen (Sensibilisierungs-Kontrolle), jungen und alten STZ-behandelten Tieren (diabetische Kontrolle) und jungen und alten STZ-behandelten Tieren mit Leerkapseln (Biokompatibilitäts-Kontrolle).

### 3.1.3 Materialgewinnung

#### 3.1.3.1 Serum und Komplement aus Wistar Ratten

Blutentnahmen erfolgten wie in der Tabelle angegeben, ansonsten 1x wöchentlich durch Herzpunktion. Die Seren wurden im Anschluss daran durch Zentrifugieren (2 x 10min bei 2.500 U/min) gewonnen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Als Komplement wurde komplettes Serum von jungen unbehandelten Wistar Ratten verwendet; das Blut wurde unmittelbar nach Entnahme auf Eis gelagert und nach dem Zentrifugieren (s.o.) portioniert und in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren und sodann bei -80°C gelagert. Die Lagerungsdauer betrug nie länger als zwei Monate.

#### 3.1.3.2 Humanes Pankreasgewebe

Pankreata von hirntoten Multiorganspendern aus der Euro-Med-Clinic Fürth und der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg wurden von Fett, Bindegewebe, Blutresten und Gefäßen befreit und mit einem Skalpell in Würfel von 0,5cm Kantenlänge zerteilt, in Tissue-Tek® (Fa. Sakura, Sakura Finetek Europe B.V.; Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet, in flüssigem

Stickstoff bei -196°C schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die warme Ischämie betrug nur wenige Minuten, da die Pankreata unmittelbar nach Explantation präpariert wurden.

### **3.1.3.3 Rattengewebe**

Niere, Herz und Leber wurden von unbehandelten, narkotisierten Wistar WU Auszuchttratten (Fa. Harlan Winkelmann; Borchem) und Lewis Inzuchttratten (Fa. Charles River; Sulzfeld) im Rahmen eines anzeigepflichtigen Versuchsvorhabens gewonnen. Nach Zerschneiden in 1cm große Gewebelöcke wurden diese wie in 3.1.3.2 weiter verarbeitet.

### **3.1.3.4 Porzines Gewebe**

Für die Bestimmung der Antikörpertiter im Serum der Wistar Ratten gegen pLI wurden stets Schnitte von jenem Spenderpankreas verwendet, aus dem auch die pLI isoliert worden waren (s.o.). Herzen, Lebern und Nieren des Schweins wurden von hirntoten Schlachtschweinen (Fa. Hollerbach; Rimpfar) gewonnen und tiefgefroren (s.o.). Hierbei handelte es sich um 6-7 Monate (100-110kg) oder 1-2 Jahre (>200kg) alte Hybridschweine, Kreuzungen aus mindestens drei reinrassigen Hausschweinerassen: Belgische Landrasse, Deutsches Edelschwein, Deutsche Landrasse, Duroc und Piétrain.

## **3.1.4 Anfertigen der Gefrierschnitte**

Aus den tiefgefrorenen Gewebelöckchen wurden mit einem Kryostaten (Frigocut-N-2800, Fa. Reichert Jung, Vertrieb Fa. Leica; Bensheim) 5µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Mit Hämatoxylin/Eosin wurde die Eignung der Schnitte für die indirekte Immunfluoreszenz festgestellt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte bei -20°C gelagert.

## **3.2 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen**

### **3.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz**

#### **3.2.1.1 Sekundärantikörper**

Zum Nachweis der an die Zielgewebe bindenden Rattenantikörper vom Typ IgG (gesamt) wurden polyklonale Antikörper aus Ziegeserum (Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L), Nr. 112-095-102, Fa. Dianova; Hamburg) und für IgM (gesamt) polyklonale Antikörper aus Kaninchenserum (FITC-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Rat IgM, µ-Chain Specific, Nr. 312-095-049, Fa. Dianova) verwendet. Zur Differenzierung der IgG Isotypen (IgG1, IgG2a und IgG2b) wurden folgende monoklonale Antikörper (mAk)



verwendet: FITC-konjugierte Mouse Anti-Rat IgG1 (Clone MARG 1-2, Nr. SM 1030F), Mouse Anti-Rat IgG2a (Clone MARG 2a-1, Nr. SM 1031F) und Mouse Anti-Rat IgG2b (Clone MARG 2b-3, Nr. SM 1032F) verwendet. Die zuletzt genannten Antikörper stammten von der Fa. Biermann; Bad Nauheim.

### **3.2.1.2 Durchführung der Färbung**

Alle Rattenserum wurden vor dem Nachweis auf IgG und IgM Antikörper für 30min bei 56°C im Wasserbad erhitzt, um die Komplementfaktoren zu inaktivieren. Die noch tiefgefrorenen Zielgewebe auf Objektträgern wurden mit 4°C kaltem Azeton in einer Färbeküvette für 10min fixiert und anschliessend 15min bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet. Danach folgten 3 Waschschriffe zu je 5min mit *phosphate buffered saline* (PBS, pH 7,3, Fa. Oxoid Ltd.; Basingstoke, UK). Restliches PBS wurde mit Papierhandtüchern von den OT abgesaugt und 50µl des zu untersuchenden Serums auf den Schnitt gegeben. Zuvor wurden die Seren mit PBS (1:2)<sup>n</sup> verdünnt, um Titerbestimmungen zu ermöglichen. Als Negativkontrollen wurden Schnitte nur mit PBS inkubiert. Nach 30min Inkubationszeit bei RT in einer feuchten Kammer, folgte ein weiterer Waschzyklus (s.o.). Nach wiederholtem Absaugen des PBS (s.o.) wurden je 50µl des FITC-konjugierten Sekundärantikörpers (s.o.) auf den Schnitt pipettiert. Alle sekundären Antikörper wurden im Vorversuch ausgetestet und in der Verdünnung 1:50 mit PBS verwendet; die Inkubationszeit betrug ebenfalls 30min in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Danach wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen und mit Eindeckmedium (Fluorescence Mounting Medium, Nr. S302380, Fa. Dako; Carpinteria, USA) eingedeckt. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte unmittelbar anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop BX50 (Fa. Olympus; Hamburg) mit dem 20x Objektiv bei 488nm Wellenlänge unter Verwendung des 530+/-20nm Bandpass-Filters.

### **3.2.1.3 Graduierung der Fluoreszenzintensität**

Die Bindungsstärke (Fluoreszenzintensität) der Antikörper an Gefäße, Azinuszellen und die Zellen der Langerhans-Inseln wurden getrennt beurteilt und graduiert:

- keine Bindung
- + sehr schwache Bindung
- ++ schwache Bindung
- +++ starke Bindung
- ++++ sehr starke Bindung

Die OT wurden stets von zwei Personen unabhängig voneinander abgelesen. Dabei wurde zunächst die absolute Fluoreszenzintensität beurteilt. Die relative Fluoreszenzintensität ergab sich aus der Differenz zwischen dem abgelesenen Absolutwert der jeweiligen Verdünnungsstufe und dem Absolutwert der negativen Kontrolle (Background). Bei allen Versuchen zum Nachweis von Antikörpern gegen porcine LI zeigten die negativen Kontrollen stets keine Bindung; in diesem Fall waren relative und absolute Fluoreszenzintensität identisch.

#### **3.2.1.4 Präinkubation der Seren**

Vor ihrer Verwendung in der indirekten Immunfluoreszenz (IF) wurden die Seren entweder mit Galaktobiose (Galaktose  $\alpha$ 1,3-Galaktose, CAS Nr. 13168-24-6, Fa. Calbiochem; Bad Soden) in zwei Konzentrationen (0,450mM und 30mM) oder in einer weiteren Versuchsreihe mit porzinem Insulin (*porcine insulin*, 25 U/mg, CAS 12584-58-6, Fa. Biotrend; Köln) in den Konzentrationen 50mg/dl, 5mg/dl, 0,5mg/dl, 0,05mg/dl, 0,005mg/dl, 0,0005mg/dl präinkubiert. Rattenserum wurde mit Galaktobiose-Lösung bzw. Insulin-Lösung zu gleichen Teilen inkubiert. Die Inkubationszeit betrug jeweils 30min und 12h bei RT unter permanenter Bewegung. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung folgte jeweils direkt nach der Präinkubation.

#### **3.2.1.5 Präinkubation der Gefrierschnitte**

Nach der Fixierung mit Azeton (s.o.) und den anschließenden Waschschritten wurden die porzinen Pankreasgefrierschnitte zunächst für 30min mit mAk präinkubiert. Für den Anti-SLA-I Nachweis wurde der mAk Mouse Anti-SLA-I (Clone PT85A, Verdünnung 1:50 mit PBS, Fa. Linaris; Wertheim-Bettingen) bzw. für den Anti-SLA-II Nachweis der mAk Mouse Anti-SLA-II (Clone MSA3, Verdünnung 1:50 mit PBS, Fa. Linaris) verwendet. Es folgten drei Waschschrritte mit PBS (s.o.), danach die indirekte Immunfluoreszenz (s.o.).

#### **3.2.2 Nachweis von SLA-I und SLA-II**

Der Nachweis wurde analog Kapitel 3.2.1.2 durchgeführt; jedoch wurde an Stelle des Rattenserums mAk der Maus gegen SLA-I bzw. SLA-II (gleiche mAk wie in Kap. 3.2.1.5) eingesetzt. Um die Reaktion sichtbar zu machen, wurden im zweiten Inkubationsschritt polyklonale Antikörper aus Pferdeserum (FITC-conjugated AffiniPure Horse Anti-Rat IgG (H+L), Cat. No. ZMF2001, Fa. Linaris) verwendet.

### **3.2.3 Lektinfärbung zum Nachweis der Gal $\alpha$ -Epitope**

Die porzinen Gefrierschnitte wurden 10min bei 4°C in Azeton fixiert, anschließend 15min luftgetrocknet; es folgten 3 Waschschrte zu je 5min mit PBS (s.o.). Überschüssiges PBS wurde mit Papierhandtüchern von den OT abgesaugt und sodann 50 $\mu$ l Fluorescein-Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lektin I (Fa. Vector Laboratories, Nr. FL-1101; Burlingame, USA) in der Konzentration von 2,0mg/ml, im Verhältnis 1:100 verdünnt mit PBS hinzu gegeben. Nach Inkubation für 1h in der feuchten Kammer im Dunkeln, folgte ein weiterer Waschzyklus. Danach wurden die Schnitte mit Eindeckmedium (s.o.) eingedeckt. Die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop erfolgte wie oben beschrieben.

Zur Darstellung der Gal $\alpha$ -Epitope wurden ca. 500 unverkapselte IEQ auf Eppendorf Caps verteilt. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die IEQ mit 100 $\mu$ l Simplicifolia Lektin (s.o.) in der Verdünnung 1:100 mit PBS für 30min inkubiert. Vor Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgten 3 Waschzyklen mit PBS.

### **3.2.4 Nachweis der klassischen und alternativen Komplementaktivierung *in vitro***

Rattenserum, bei denen nach Transplantation von mpLI hohe Antikörpertiter gegen porzine Inselzellen in der IF ermittelt wurden, wurden mit unverkapselten und mikroverkapselten pLI für 30min bei RT inkubiert (100 $\mu$ l Serum und 500 porzine IEQ). Der Kontrollversuch enthielt anstelle des Serums 100 $\mu$ l HAM's F12 (Fa. CellConcepts) (Reaktion entspricht dem alternativen Weg der Komplementaktivierung). Anschließend wurden alle Überstände abgesaugt und pLI/mpLI mit 400 $\mu$ l HAM's F12 gewaschen, um freie Antikörper zu entfernen. Nach Absaugen der Waschflüssigkeit wurden 400 $\mu$ l Wistar Komplement (s.o.) unverdünnt in jeden Ansatz gegeben. Die relevanten Kontrollen erhielten lediglich das gleiche Volumen HAM's F12. Nach 30min Inkubation bei RT wurden die Überstände abgesaugt. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit 400 $\mu$ l HAM's F12. Um das Versuchsergebnis sichtbar zu machen, folgte die Färbung der noch lebenden Zellen (unverkapselt oder verkapselt) mit Fluoreszeindiaceetat/Propidiumjodid (FDA/PI).

### **3.2.5 Vitalitätsfärbung mit FDA/PI**

Der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeindiactetat (Fa. Sigma; Steinheim) färbt vitale Zellen, so auch Inselzellen, leuchtend grün; Propidiumjodid (Fa. Sigma) färbt tote Inselzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet leuchtend rot. Für die Färbung wurde 1mg FDA in 1ml

Azeton gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt. Zu den fraglichen Zellen in Suspension wurden 0.5µl FDA-Stammlösung pipettiert, die Probe gut durchmischt und bei 37°C für 15min inkubiert. Sofort anschließend wurden die Inselzellen unter Zugabe eines Tropfens PI-Lösung auf einen OT überführt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (s.o.) bezüglich des Anteils grün leuchtender Zellen analysiert.

### **3.2.6 Überprüfung der Alginat-Kapseln als natürliche Barriere für Antikörper**

Für diesen Versuch wurden ausschließlich Seren von Wistar Ratten mit hohen IgG und IgM Antikörpertitern gegen pLI verwendet. Alle Seren wurden vor dem Test Komplement-inaktiviert (s.o.), um die Komplementfaktoren zu zerstören. Sodann folgte die Verdünnung der Seren mit PBS pH 7,3 in einer geometrischen Verdünnungsreihe (1:2)<sup>n</sup>. Zu 100 pLI-gefüllten Mikrokapseln wurden 200µl des fraglichen Serums in unterschiedlichen Verdünnungsstufen gegeben und die Ansätze für drei Tage im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Die negativen Kontrollen wurden in 200µl PBS inkubiert. Danach wurde das Serum abgesaugt und die mpLI wurden 3x mit je 1ml PBS gewaschen. Im folgenden Inkubationsschritt wurden die markierten Sekundärantikörper (s.o), 1:50 mit PBS verdünnt und zu den Proben hinzugefügt. Es folgte die Inkubation für 12h bei 4°C im Kühlschrank. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit PBS (s.o.). Die lichtmikroskopische Auswertung der Antikörperbindung erfolgte unmittelbar nach Eindecken der Proben auf dem OT unter dem Fluoreszenzmikroskop (s.o.).

### **3.2.7 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse**

Die Auswertung der Versuche erfolgte immer unabhängig durch 2 Personen an dem Fluoreszenzmikroskop BX50 (Fa. Olympus; 488nm Wellenlänge unter Verwendung des 530+/-20nm Bandpassfilters). Zusätzlich wurde die Identität der Präparate auf den OT verschlüsselt, um subjektive Ablesefehler weitestgehend zu vermeiden. Alle Bestimmungen wurden doppelt durchgeführt. Die Fotodokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera ColorView 12 (Fa. Soft Imaging System SIS; Münster) unter Verwendung der Bilddarstellungs-Software analySIS<sup>®</sup> Version 3.2 (Fa. Soft Imaging System SIS).

Alle Antikörpertiter wurden durch reziproke Werte dargestellt (Kehrwert; 1/x). Es wurde jeweils der Median als Zentralwert der Zahlenreihe angegeben. Dieser ist per definitionem der mittlere aller der Größe nach sortierten Variablenwerte. Alle Tabellen sowie die Berechnung des Medians wurden mit Microsoft<sup>®</sup> Excel 2002 angefertigt.

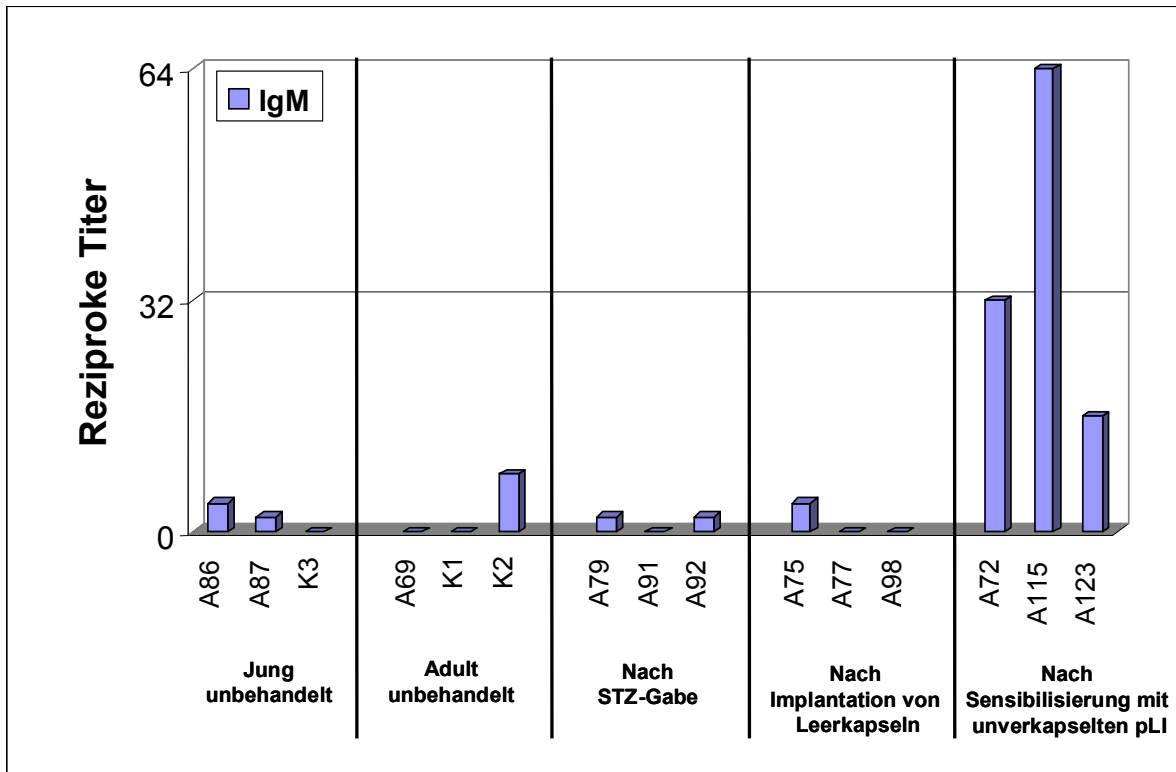
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Natürliche und induzierte Antikörper gegen porcine Langerhans-Inseln im Serum von Wistar Ratten**

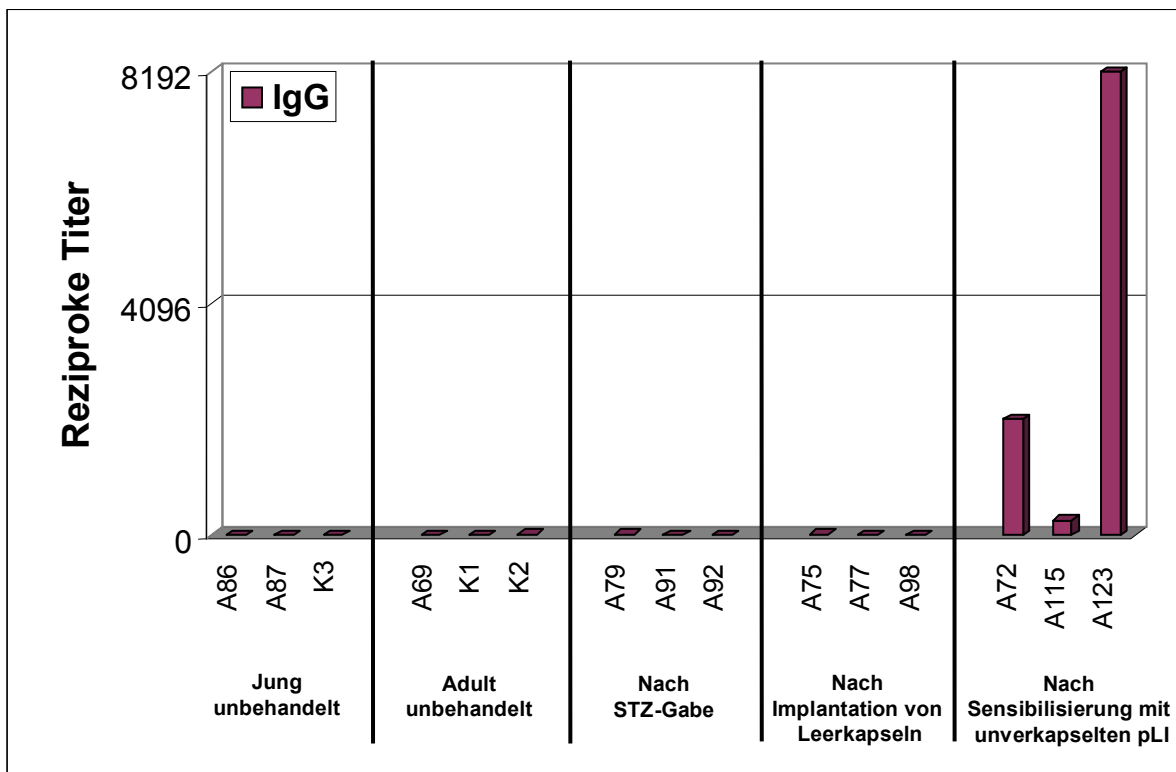
Um eine Aussage über natürliche, präformierte Antikörper gegen porcine Langerhans-Inseln treffen zu können, wurde in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht, ob junge (2-3 Monate) und adulte (1-1,5 Jahre) unbehandelte Wistar Ratten Antikörper im Serum besitzen, die mit pLI kreuzreagieren. Auszuschließen war auch, dass das Betazellgift *Streptozotocin*, das zur Induktion des medikamentösen Diabetes verwendet wird, mit der Bildung der fraglichen Antikörper interferiert. Ebenso war das Serum von Ratten zu untersuchen, die Leerkapsel-Implantate intraperitoneal erhalten hatten. Als Positivkontrolle diente das Serum von Ratten, die 1x oder 3x (in wöchentlichen Abständen) mit unverkapselten pLI sensibilisiert worden waren. Dazu wurden die Komplement-inaktivierten Seren, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, auf Gefrierschnitten der porcinen Spenderpancreata hinsichtlich der Bindung von IgM und IgG Antikörpern gegen pLI analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3A und 3B dargestellt: Danach schwanken die reziproken IgM Titer bei jungen, adulten, STZ-behandelten und Leerkapsel-implantierten Tieren zwischen 0 und 8, bei sensibilisierten Tieren zwischen 16 und 64. Die reziproken IgG Titer liegen bei jungen, adulten, STZ-behandelten und Leerkapsel-implantierten Tieren zwischen 0 und 2, bei den sensibilisierten Tieren erwartungsgemäß sehr viel höher, d.h. zwischen 256 und 8.192.

### **4.2 Antikörpertiter nach Transplantation mikroverkapselter porciner Langerhans-Inseln**

Im Kapitel 4.1 wurde gezeigt, dass Seren junger und adulter unbehandelter Ratten keine oder nur geringe Mengen natürlicher xenoreaktiver Antikörper gegen pLI besitzen, ebenso die Seren STZ-behandelter und Leerkapsel-implantierter Tiere (negative Kontrollen). Im Gegensatz dazu wurde in den Seren von Ratten, die mit pLI sensibilisiert worden waren, hohe Antikörpertiter nachgewiesen (positive Kontrollen). Im Folgenden wurden Seren von Wistar Ratten, die mikroverkapselte pLI erhalten hatten, nach der gleichen Methode wie in Kapitel 4.1 getestet. Es galt zu prüfen, ob die Mikroverkapselung der pLI mit Barium-Alginat einen wirksamen Schutz vor Induktion einer humoralen Immunantwort darstellt. Die untersuchten Seren wurden zwischen dem 5. und 15. Tag nach Transplantation entnommen.

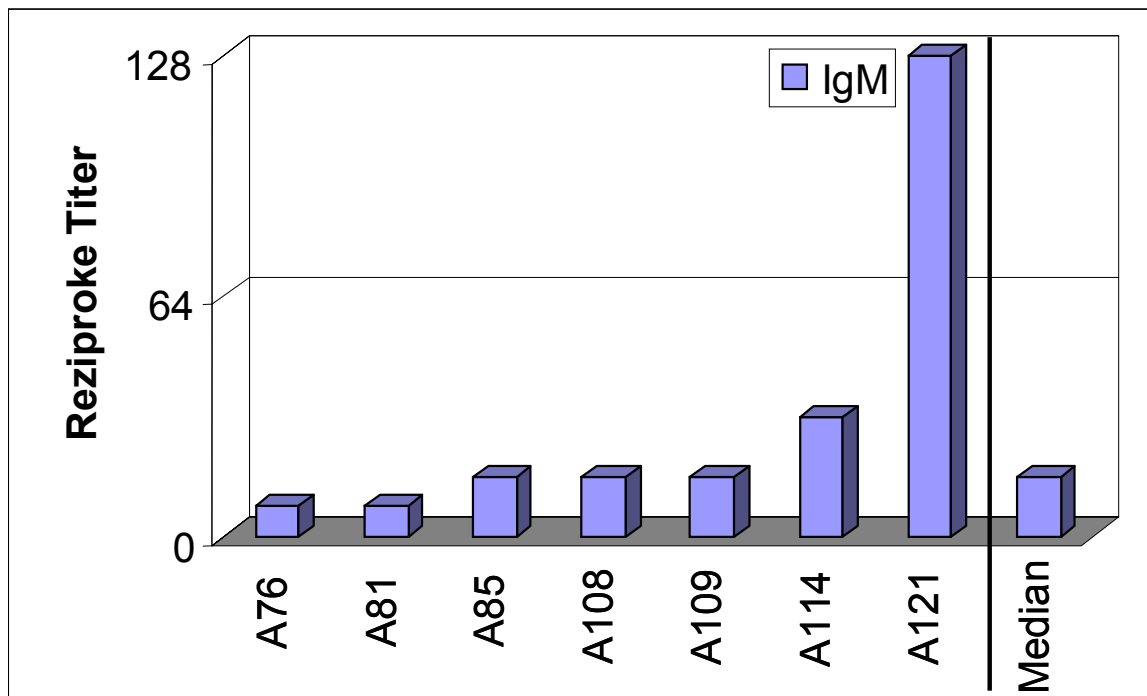


**Abb. 3A:** IgM Titer gegen pLI im Serum junger und adulter unbehandelter, STZ-behandelter und Leerkapselimplantierter Wistar Ratten, sowie nach Sensibilisierung (i.p.) mit unverkapselten pLI; indirekte Immunfluoreszenz mit Gefrierschnitten des porzinen Spenderpankreas; die Angaben A86...A123 beziehen sich jeweils auf ein Tier.

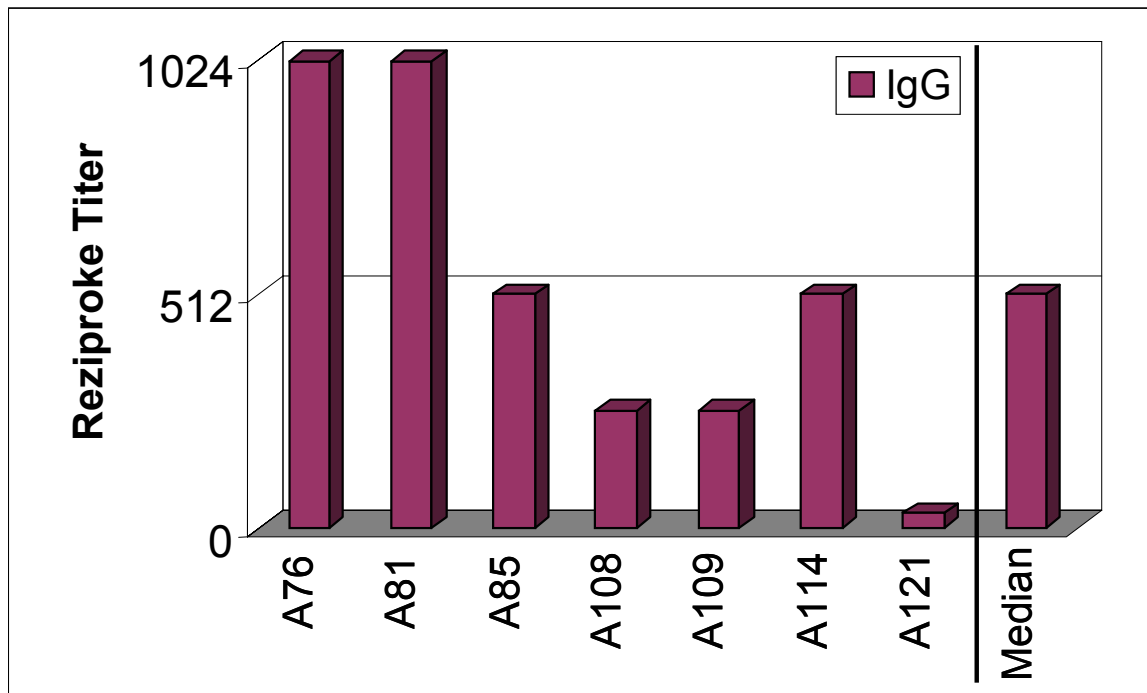


**Abb. 3B:** IgG Titer gegen pLI im Serum junger und adulter unbehandelter, STZ-behandelter und Leerkapselimplantierter Wistar Ratten, sowie nach Sensibilisierung (i.p.) mit unverkapselten pLI; indirekte Immunfluoreszenz mit Gefrierschnitten des porzinen Spenderpankreas; die Angaben A86...A123 beziehen sich jeweils auf ein Tier.

Das Ergebnis für die Seren aus der Versuchsgruppe *Kurzzeitfunktion* ist in Abb. 4A und 4B dargestellt: Danach schwanken die reziproken IgM Titer in Tieren mit kurzer Transplantatfunktion zwischen 8 und 128. Der Median liegt bei 16. Die reziproken IgG Titer schwanken zwischen 8 und 1.024 (Median 512). Bemerkenswert ist, dass die Ratte A121 mit einem hohem IgM Titer nur einen mässigen IgG Titer aufweist.

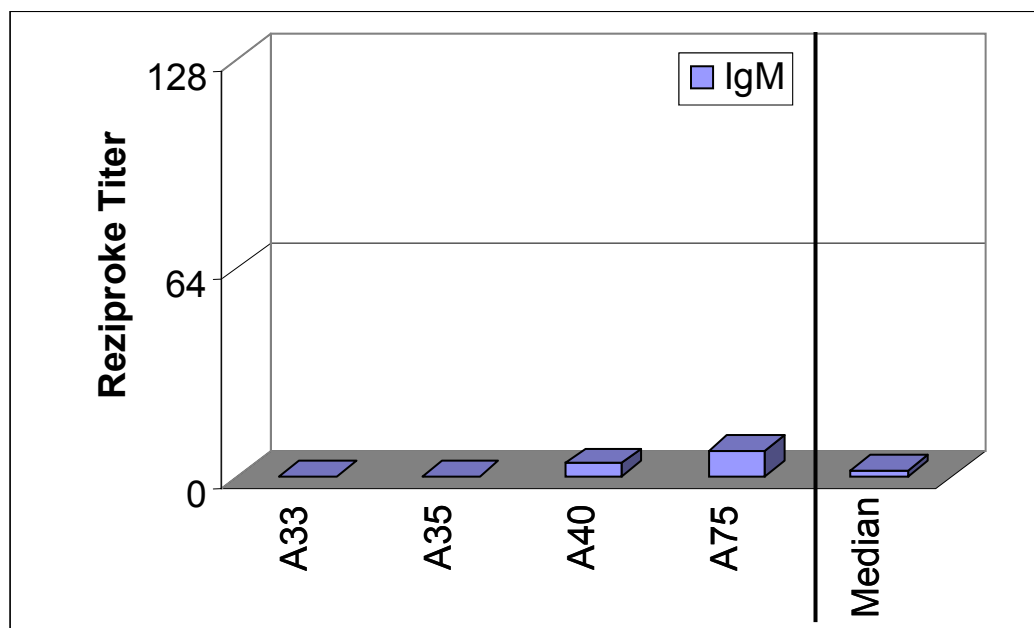


**Abb. 4A:** IgM Titer gegen pLI im Serum von Wistar Ratten mit *Kurzzeitfunktion* ihrer Transplantate; indirekte Immunfluoreszenz mit Gefrierschnitten des porzinen Spenderpankreas; die Angaben A76...A121 beziehen sich jeweils auf ein Tier. Median n=7.



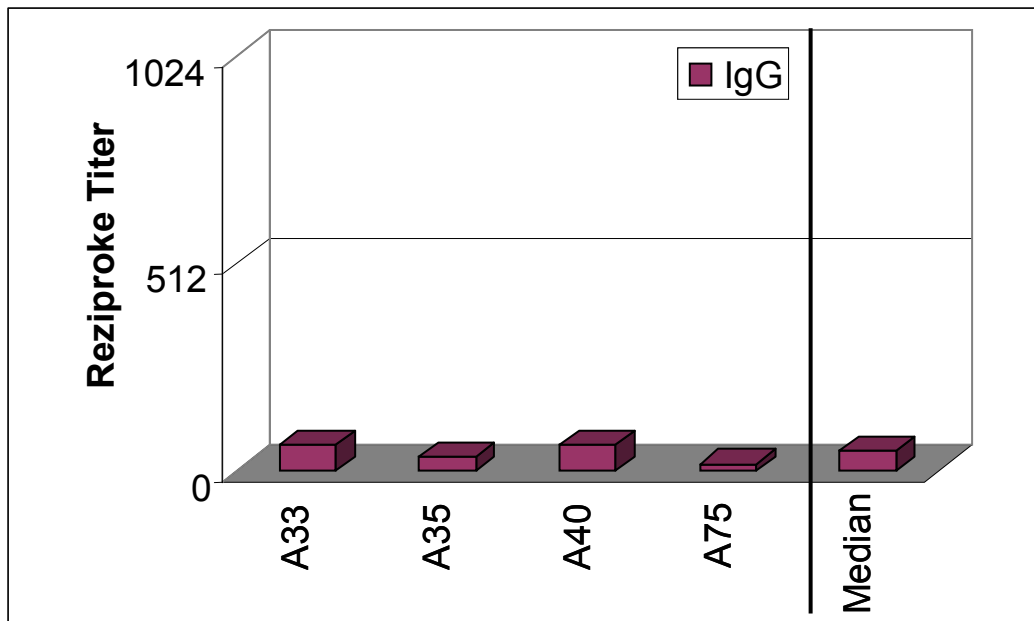
**Abb. 4B:** IgG Titer gegen pLI im Serum von Wistar Ratten mit *Kurzzeitfunktion* ihrer Transplantate; indirekte Immunfluoreszenz mit Gefrierschnitten des porzinen Spenderpankreas; die Angaben A76...A121 beziehen sich jeweils auf ein Tier; Median n=7.

Abbildung 5A und 5B zeigen die Serumanalyse der Versuchsgruppe mit *Langzeitfunktion*: Hier liegen die reziproken IgM Titer zwischen 0 und 8 (Median 2). Die reziproken IgG Titer schwanken zwischen 16 und 64 (Median 48).



**Abb. 5A:** IgM Titer gegen pLI im Serum von Wistar Ratten mit *Langzeitfunktion* ihrer Transplantate; indirekte Immunfluoreszenz mit Gefrierschnitten des porzinen Spenderpankreas; die Angaben A33...A75 beziehen sich jeweils auf ein Tier; Median n=4.

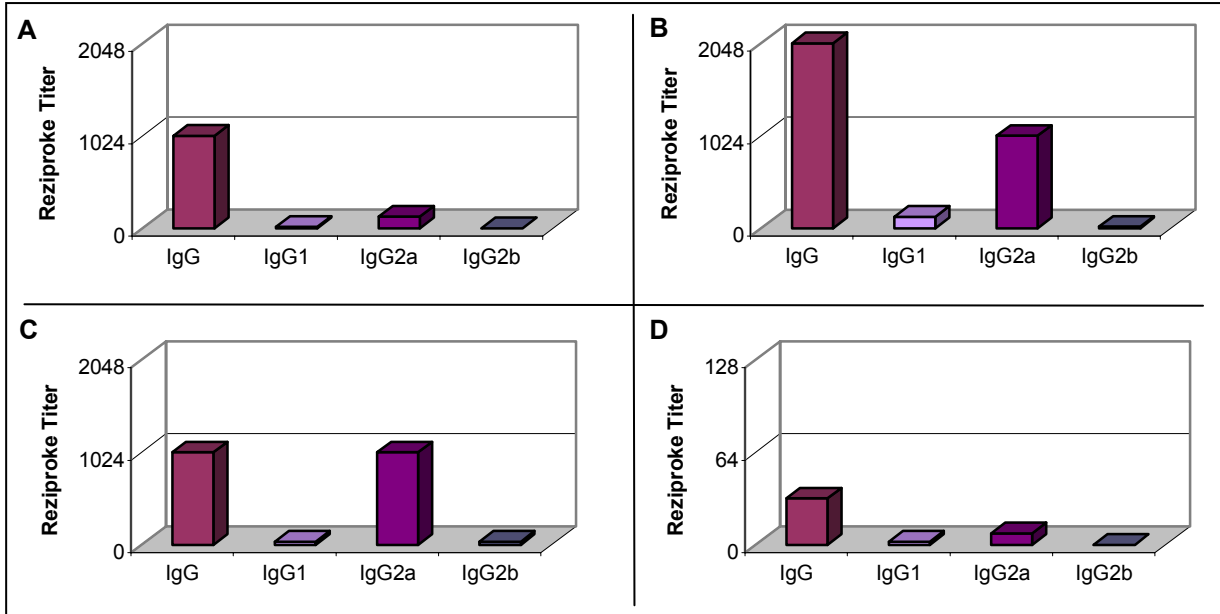




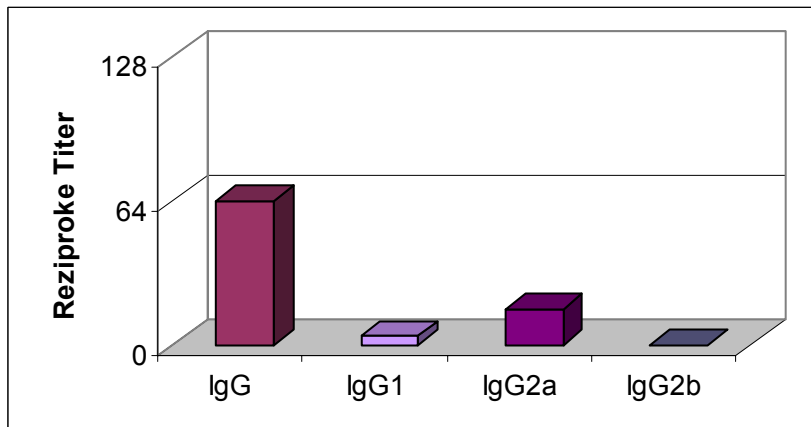
**Abb. 5B:** IgG Titer gegen pLI im Serum von Wistar Ratten mit *Langzeitfunktion* ihrer Transplantate; indirekte Immunfluoreszenz mit Gefrierschnitten des porzinen Spenderpankreas; die Angaben A33...A75 beziehen sich jeweils auf ein Tier; Median n=4.

### 4.3 Bestimmung der Antikörper-Isotypen nach Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln

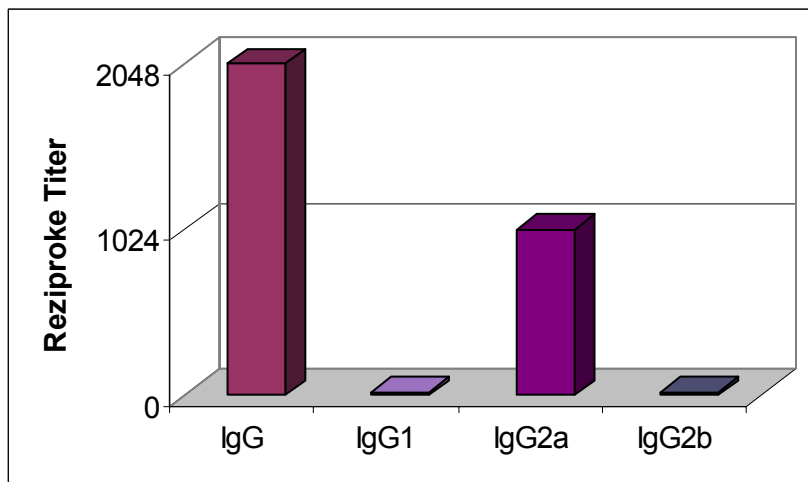
Um die Zusammensetzung der in Kapitel 4.2 identifizierten, Transplantat-induzierten IgG Antikörper zu analysieren, wurde mit entsprechenden Sekundärantikörpern eine Isotypenbestimmung in der indirekten Immunfluoreszenz durchgeführt (s. Kapitel 3.2.1). Die Frage nach der Präsenz der Isotypen IgG1, IgG2a und IgG2b erfolgte im Serum jener Tiere, deren mpLI nur *kurzfristig* funktioniert hatten und bei denen erhöhte IgG Titer nachgewiesen worden waren, bzw. das Serum von A35, einem Tier mit *Langzeitfunktion* seiner mpLI. Als Kontrollen dienten die Seren der Tiere, die mit unverkapselten pLI sensibilisiert worden waren. Auf den Nachweis von IgG3 und IgG4 wurde hier verzichtet, weil Sekundärantikörper gegen diese Isotypen der Ratte zum Zeitpunkt der Untersuchungen käuflich nicht erhältlich waren; zudem ist bekannt, dass IgG3 und IgG4 nur in sehr geringen Mengen im Serum vorhanden sind [60]. Die Abbildungen 6A-D dokumentieren am Beispiel von vier Tieren mit *Kurzzeitfunktion*, dass nach Transplantation mikroverkapselter pLI vornehmlich Antikörper des Isotyps IgG2a gebildet werden. Die Titer der Isotypen IgG1 und IgG2b sind vergleichsweise niedrig. In der Versuchsgruppe mit *Langzeitfunktion* tritt das gleiche Isotypenspektrum auf, jedoch sehr viel schwächer ausgeprägt (Abb. 7). Abbildung 8 dokumentiert beispielhaft die Isotypenanalyse für die sensibilisierte Ratte A72; die insgesamt 3 sensibilisierten Tiere zeigten ein der Versuchsgruppe *Kurzzeitfunktion* vergleichbares Antikörper-Spektrum.



**Abb. 6:** Isotypenbestimmung im Serum von Wistar Ratten mit *Kurzzeitfunktion* ihrer mpLI-Transplantate, am Beispiel von A76 (A), A81 (B), A140 (C) und A121 (D); die Serumentnahmen erfolgten zwischen dem 5. (A121) und dem 15. (A76, A81, A140) postoperativen Tag.



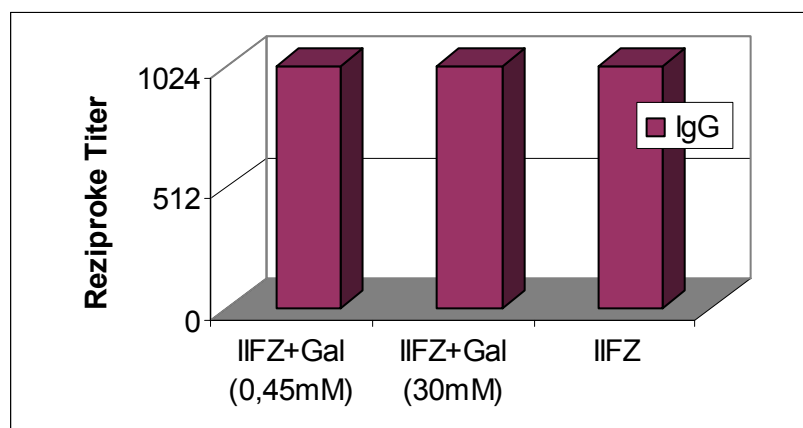
**Abb. 7:** Isotypenbestimmung im Serum von Wistar Ratten mit *Langzeitfunktion* ihrer mpLI-Transplantate, hier am Beispiel von A35 (insgesamt n=4).



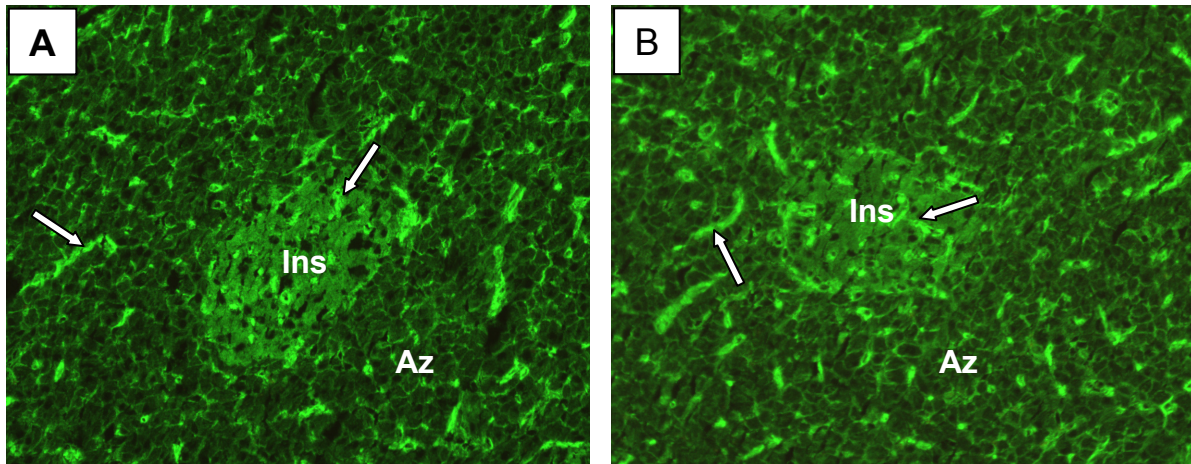
**Abb. 8:** Isotypenbestimmung im Serum von Wistar Ratten nach 3-facher i. p. Sensibilisierung mit unverkapselten pLI, hier am Beispiel von A72 dargestellt (insgesamt n=3).

#### 4.4 Nachweis von Antikörpern gegen das Gal $\alpha$ -Epitop

Unklar war, ob es sich bei den o.g. Antikörpern nach Transplantation von pLI und mpLI um Antikörper gegen das Kohlenhydrat-Epitop *Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R* (abgekürzt Gal $\alpha$ ) handelt. Da Schweine und Ratten das Epitop auf verschiedenen Körperzellen, insbesondere Endothelzellen, exprimieren, dürften Ratten nach Transplantation porzinen Gewebes keine gegen dieses Epitop gerichteten Antikörper bilden [67]. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Seren transplantiert Wistar Ratten mit Galaktobiose präinkubiert, um gegebenenfalls vorhandene Anti-Gal $\alpha$ -Antikörper zu komplexieren (s. Kapitel 3.2.1.4) [68]; folglich würde deren Antigen-spezifische Bindung auf dem Pankreas-Gefrierschnitt unterbunden, und die Grünfärbung bliebe aus. Sofern keine Anti-Gal $\alpha$ -Antikörper vorhanden sind, müssten beide Seren, das zuvor behandelte wie auch das unbehandelte, eine gleich starke Grünfärbung des Schnittes in der indirekten Immunfluoreszenz zeigen. Das Ergebnis zeigt, dass nach Präinkubation mit einer niedrigen und einer hohen Galaktobiose-Konzentration der IgG Titer unverändert bleibt (Abb. 9). Weder mit der errechneten Konzentration zur Absättigung aller IgG Bindungsstellen, 0,45mM, noch mit der um den Faktor 66,66 willkürlich erhöhten Konzentration von 30mM wurde ein Hemmeffekt erzielt. Dieser Versuch wurde mit dem Serum der Ratten A72 und A76 je 2x durchgeführt. Abbildung 10 zeigt das zugehörige Fluoreszenzbild mit und ohne Präinkubation beispielhaft für A76: Die Grünfärbung ist in beiden Langerhans-Inseln gleichermaßen intensiv.

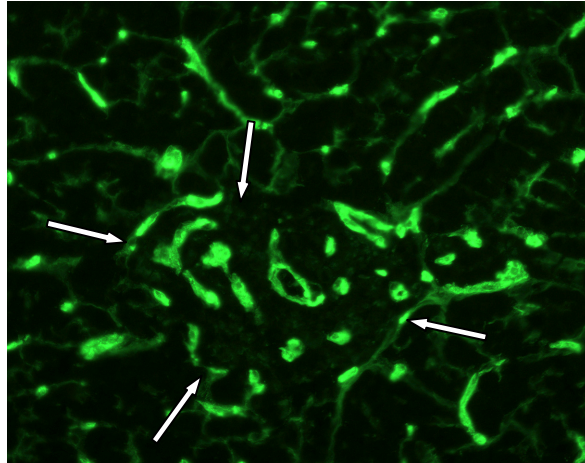


**Abb. 9:** IgG Titer gegen Inselzellen auf porzinen Pankreas-Gefrierschnitten in der indirekten Immunfluoreszenz, nach Präinkubation des Serums der Wistar Ratte A76, deren mpLI-Transplantat nur *kurzzeitig* funktioniert hatte, mit 0,45mM und 30mM Galaktobiose (Gal). Durch die Präinkubation sollten – sofern vorhanden – Anti-Gal $\alpha$ -Antikörper im o.g. Serum komplexiert werden. Insgesamt 4 Untersuchungen, A72 (2x) und A76 (2x).



**Abb. 10:** Nachweis von IgG Antikörpern im Serum der Wistar Ratte A76, deren mpLI-Transplantat nur *kurzzeitig* funktioniert hatte (indirekte Immunfluoreszenz am porzinen Pankreas-Gefrierschnitt). A: nach Präinkubation des Serums mit 30mM Galaktobiose (hier nicht gezeigt die Präinkubation mit 0,45mM); B: ohne Präinkubation; in beiden Fällen ist die Grünfärbung der porzinen Inselzellen (Ins), als Folge der Bindung von non-Gal $\alpha$ -Antikörpern gleich stark (+++ = starke Färbung); die Antikörper binden zudem an Kapillaren im exokrinen und endokrinen Gewebe (Pfeile; +++++ = sehr starke Färbung) und an Azinuszellen (Az; ++ = schwache Färbung).

Danach bilden Wistar Ratten nach mpLI-Transplantation – wie erwartet – keine Anti-Gal $\alpha$ -Antikörper. Um aber grundsätzlich das Vorhandensein und die Lokalisation von *Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R*-Epitopen auf den porzinen Pankreasschnitten zu dokumentieren, wurden die Schnitte mit dem FITC-gekoppelten Lektin I von *Griffonia Simplicifolia*, das an Gal $\alpha$ -Epitope bindet, inkubiert (s. Kapitel 3.2.3) und mikroskopisch analysiert. Die Färbung mit diesem Lektin zeigt, dass das Gal $\alpha$ -Epitop ausschließlich auf den Zellen der Pankreasgänge und den Endothelzellen exprimiert wird, nicht aber auf den endokrinen Zellen (Abb. 11).



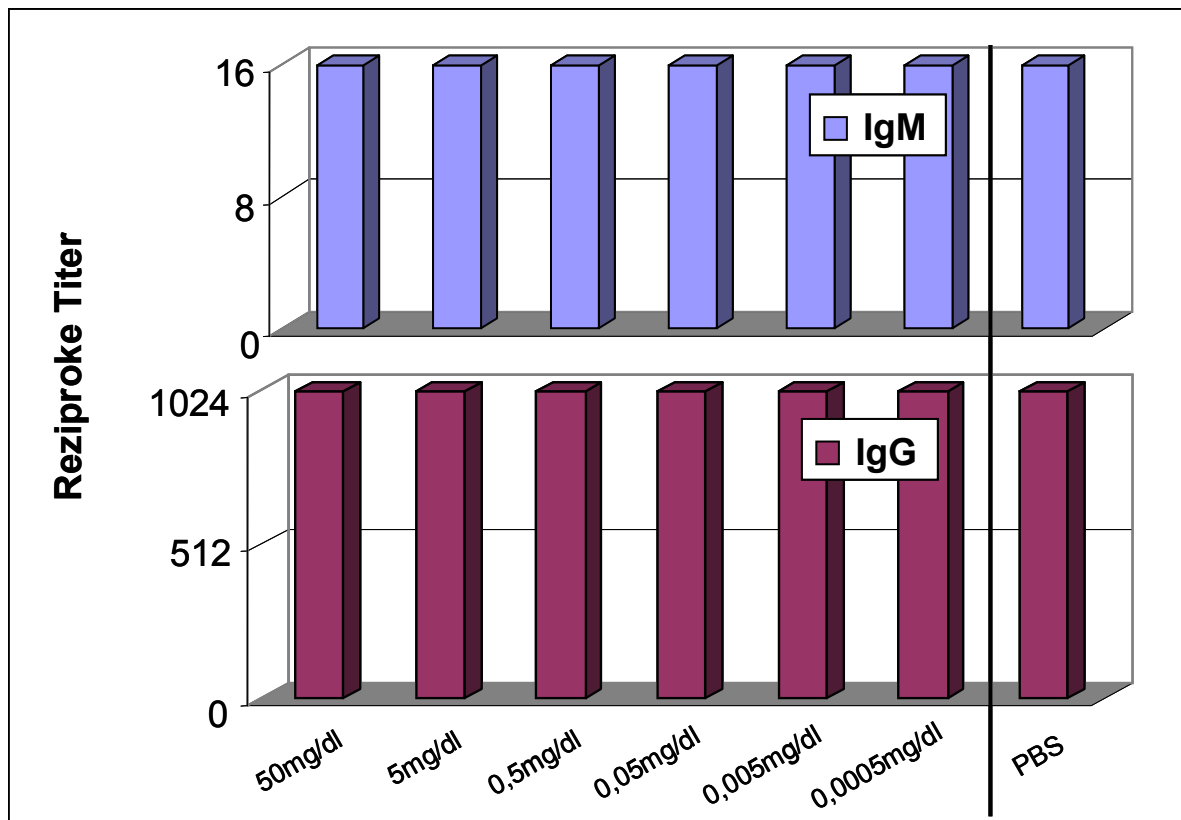
**Abb. 11:** Inkubation eines porzinen Pankreas-Gefrierschnittes mit FITC-gekoppeltem Lectin I von *Griffonia Simplicifolia*; das Lectin bindet ausschließlich an Zellen der Pankreasgänge und Kapillaren im endokrinen und exokrinen Gewebe, nicht aber an die porzinen Inselzellen (die Pfeile markieren grob den Umriss einer pLI).

In einem weiteren Versuch wurde *Griffonia Simplicifolia* mit isolierten, 24h kultivierten pLI inkubiert, um die Frage zu klären, ob Gal $\alpha$ -Epitope zum Zeitpunkt der Transplantation in den Empfänger mit übertragen werden. So ist seit langem bekannt, dass die Endothelzellen in den pLI mittels *In-Vitro*-Kultur zerstört werden, folglich dürfte das Immunsystem der Ratten mit den Gal $\alpha$ -Epitopen der pLI kaum in Kontakt kommen. Diese Annahme konnte insofern bestätigt werden, als kultivierte pLI nach Inkubation mit dem *Griffonia Simplicifolia* Lektin – im Gegensatz zu den frisch isolierten pLI – keine Grünfärbung in der Fluoreszenzmikroskopie zeigten (nicht gezeigt). Demnach werden ausschließlich pLI transplantiert, die keine Gal $\alpha$ -Epitope mehr exprimieren.

#### 4.5 Nachweis von Antikörpern gegen porzines Insulin

Porzines Insulin unterscheidet sich vom Ratteninsulin in 4 Aminosäuren (1 Position in der  $\alpha$ -Kette und 3 Positionen in der  $\beta$ -Kette). Sollte dieser Unterschied im Aufbau beider Insuline dazu führen, dass das porzine Insulin von den Wistar Ratten als Fremdprotein erkannt wird, müssten sie nach mpLI- bzw. pLI-Transplantation Antikörper gegen das artfremde porzine Insulin bilden. Um dies zu untersuchen, wurde das Serum einer Wistar Ratte mit *Kurzzeitfunktion* nach mpLI-Transplantation wie in Kapitel 4.4 beschrieben vor der indirekten Immunfluoreszenz mit porzinem Insulin in verschiedenen Konzentrationen inkubiert (s. Kapitel 3.2.1.4). Abbildung 12 zeigt, dass die Präinkubation des Serums mit porzinem Insulin in einer logarithmischen Verdünnungsreihe von 50mg/dl bis 0,0005mg/dl keinen Abfall der IgG bzw. IgM Titer als Folge einer Antikörper-Komplexierung erzeugt. Danach handelt es sich bei den

in Kapitel 4.2 nachgewiesenen Antikörpern gegen pLI nicht um Antikörper gegen porcines Insulin.

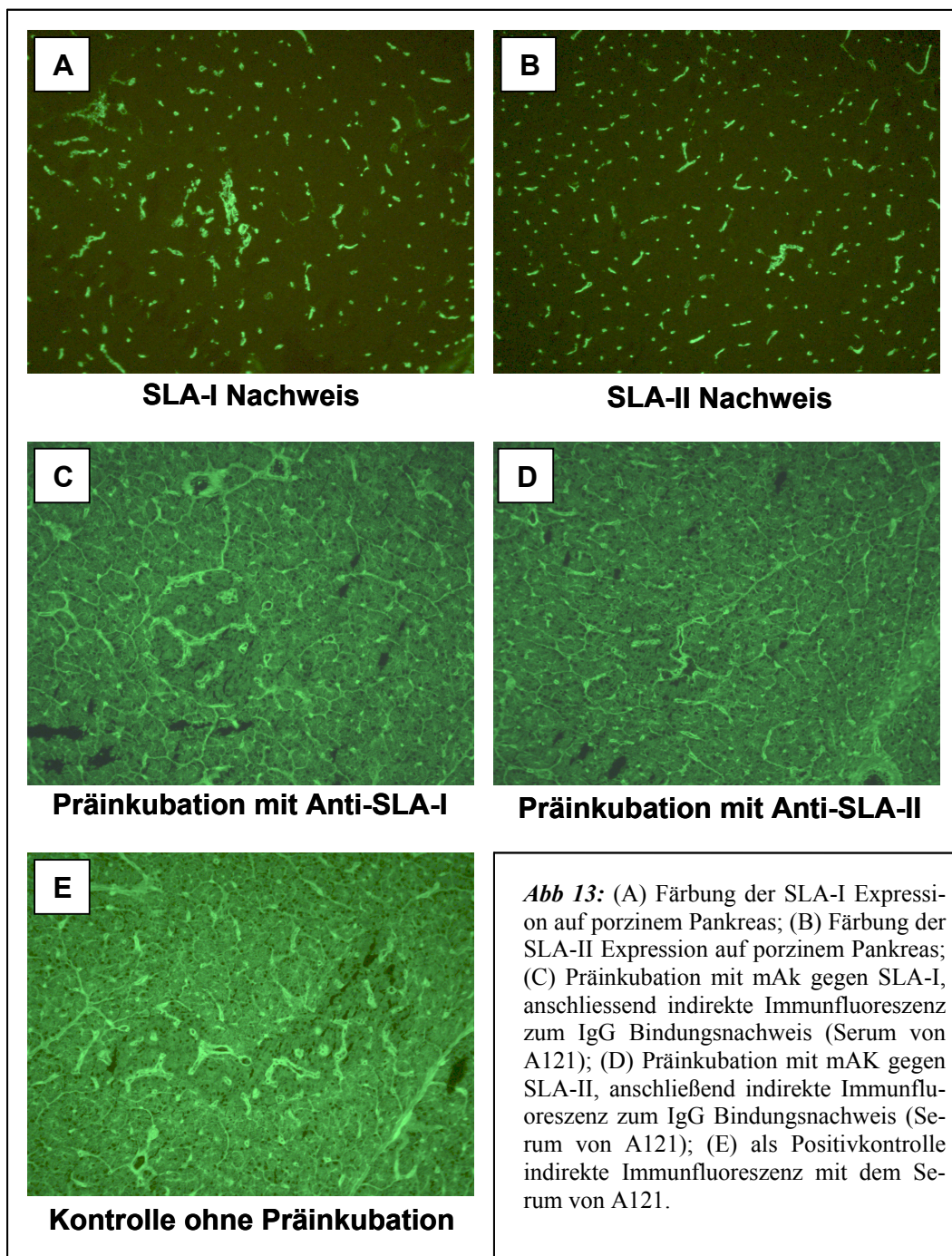


**Abb. 12:** IgM und IgG Titer im Serum einer Wistar Ratte mit *Kurzzeitfunktion* nach mpLI-Transplantation (A76). Vor der indirekten Immunfluoreszenz wurde das Serum mit porcinem Insulin in 6 Konzentrationen inkubiert, um ggf. vorhandene Anti-Insulin Antikörper zu komplexieren.

#### 4.6 Nachweis von Antikörpern gegen SLA-I und SLA-II Moleküle

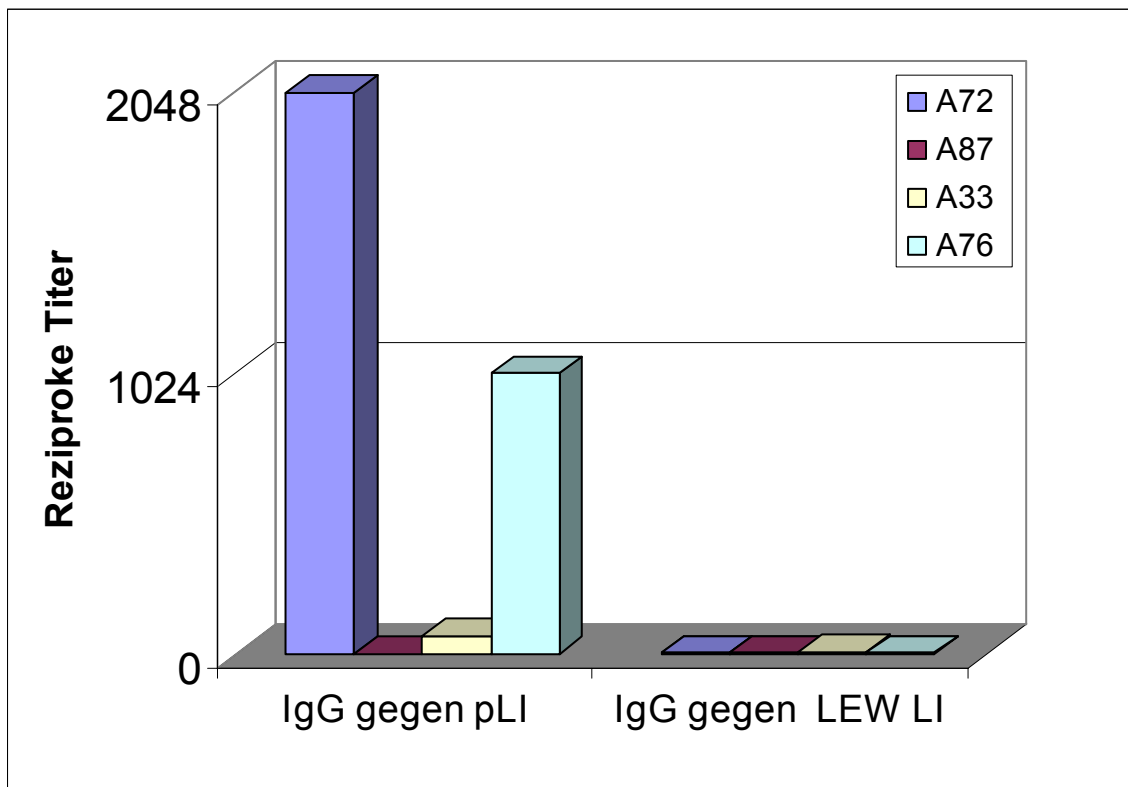
Unklar war, ob die o.g. IgG Serumantikörper nach xITX spezifisch mit *swine leukocyte antigen class I* (SLA-I) und/oder *swine leukocyte antigen class II* (SLA-II) reagieren. Um diese Frage zu untersuchen, wurde zunächst der qualitative Nachweis der SLA-I und SLA-II Expressionen im porcinen Pankreas mit mAk Maus-Anti-SLA-I und Maus-Anti-SLA-II geführt. In einem zweiten Versuch wurden die Epitope zunächst mit jeweils einem dieser Antikörper abgesättigt, bevor das aus den transplantierten Ratten stammende Serum auf dem porcinen Pankreasschnitt in der indirekten Immunfluoreszenz, wie oben genannt, getestet wurde. Würde das Rattenserum Anti-SLA-I und/oder Anti-SLA-II Antikörper enthalten, wäre eine Bindung nicht möglich, da die zugehörigen Epitope bereits besetzt wären; der Schnitt bliebe in der Fluoreszenz ungefärbt oder wäre zumindest deutlich schwächer gefärbt. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis dieser Versuche: (1) Sowohl mit Anti-SLA-I (A) als auch mit Anti-SLA-II (B) Antikörpern werden im porcinen Pankreas die Endothelzellen der kleinen und großen Gefäße, Gewebemakrophagen und die Epithelzellen der ausführenden Gänge gefärbt. Die

Inselzellen bleiben komplett ungefärbt. (2) Werden die Schnitte mit den Anti-SLA-I (C) oder Anti-SLA-II (D) Antikörpern präinkubiert und im zweiten Schritt mit dem Serum A121 inkubiert, so beobachtet man das mit diesem Serum typische Fluoreszenzbild, das sich von jenem des Kontrollversuchs (D; ohne Präinkubation) nicht unterscheidet. Mit anderen Worten: In allen drei Fällen sind die Endothelzellen, die Epithelzellen und die Gewebemakrophagen stark bis sehr stark grün gefärbt. Eine Abschwächung der Grünfärbung speziell dieser in Abb. 13A und B identifizierten Strukturen ist in Abb. 13C und D nicht erkennbar.



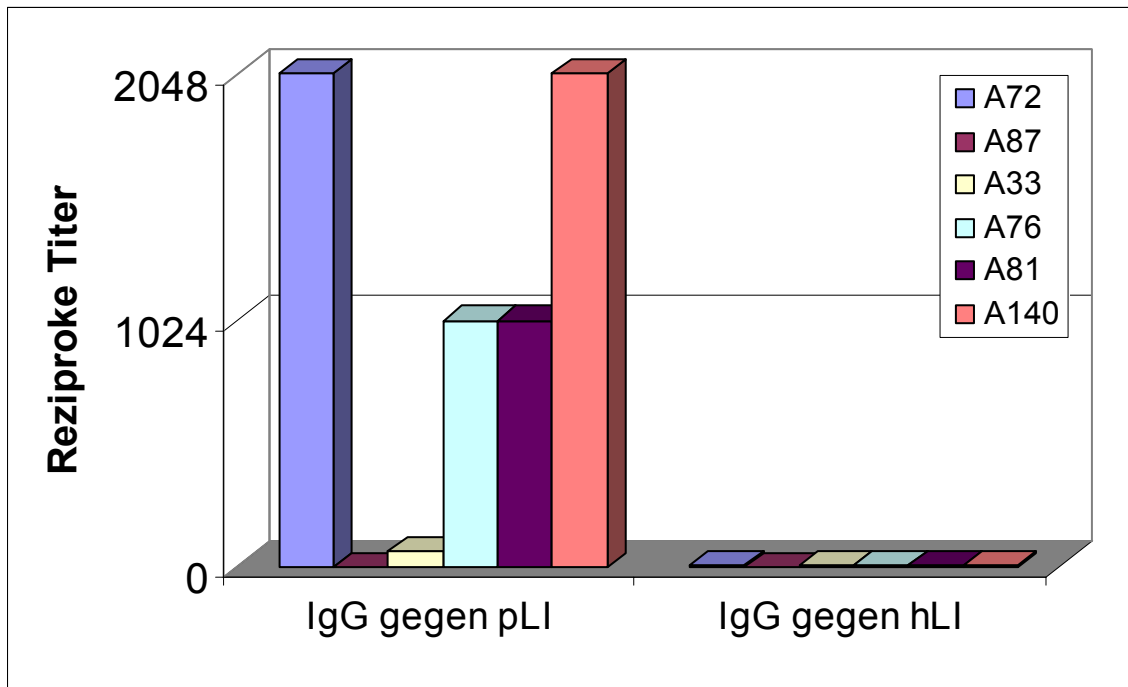
#### 4.7 Spezies-Spezifität der Antikörper gegen pLI

Im folgenden sollte in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht werden, ob die gegen porcine Inselzellen gerichteten Antikörper Spezies-spezifisch sind. Als allogenes Gewebe wurde das Pankreas von Lewis Ratten und als xenogenes Gewebe humanes Pankreas verwendet (s. Kapitel 3.1.3.3 und 3.1.3.2). Abbildung 14 zeigt die IgG Titer im Serum von 4 Wistar Ratten nach pLI-/mpLI-Transplantation auf porzinen und LEW Pankreas-Gefrierschnitten vergleichsweise in einem ersten Versuch. Abbildung 15 zeigt die IgG Titer im Serum der gleichen 4 Wistar Ratten sowie zwei weiterer nach pLI-/mpLI-Transplantation auf porzinen und humanen Pankreas-Gefrierschnitten vergleichsweise in einer separaten zweiten Versuchsreihe. Danach sind IgG Antikörper gegen porcine Langerhans-Inseln, sofern vorhanden, Spezies-spezifisch, d.h. sie reagieren weder mit dem endokrinen Rattengewebe noch mit dem humanen Gewebe; eine Kreuzreaktivität liegt demnach nicht vor.



**Abb. 14:** Versuchsreihe 1; IgG Titer gegen pLI (linker Säulenblock) und LEW LI (rechter Säulenblock); verwendet wurde das Serum einer Wistar Ratte nach Sensibilisierung mit pLI (A72), einer jungen unbehandelten Wistar Ratte (A87), einer Wistar Ratte mit *Langzeitfunktion* nach mpLI-Transplantation (A33) und einer Wistar Ratte mit *Kurzzeitfunktion* nach mpLI-Transplantation (A76). Indirekte Immunfluoreszenz mit Pankreas-Gefrierschnitten.





**Abb. 15:** Versuchsreihe 2; IgG Titer gegen pLI (linker Säulenblock) und humane (h) LI (rechter Säulenblock); verwendet wurde das Serum einer Wistar Ratte nach Sensibilisierung mit pLI (A72), einer jungen unbehandelten Wistar Ratte (A87), einer Wistar Ratte mit *Langzeitfunktion* nach mpLI-Transplantation (A33) und 3 Wistar Ratten mit *Kurzzeitfunktion* nach mpLI-Transplantation (A76, A81, A140). Indirekte Immunfluoreszenz mit Pankreas-Gefrierschnitten.

#### 4.8 Gewebe-Spezifität der Antikörper gegen porcine Langerhans-Inseln

Um eine Aussage darüber zu treffen, ob die oben identifizierten Serumantikörper nach Transplantation mit pLI/mpLI (s. Kapitel 4.2) ausschließlich an Inselzellen binden, wurden die besagten Seren auch auf ihre Reaktion mit Nieren-, Herz- und Lebergewebe der jeweiligen Spenderschweine in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht (Tab. 2). Bei allen porcinen Geweben konnte eine starke bis sehr starke Bindung der Serumantikörper mit den Endothelzellen der kleinen, insbesondere aber der großen Gefäße beobachtet werden. Dies galt vor allem für die Bindung der IgM Antikörper. Die Nierenparenchymzellen, Myokardiozyten und Hepatozyten blieben in der indirekten Immunfluoreszenz ungefärbt; mit anderen Worten, diese Zellen waren keine Zielzellen für die durch das Inseltransplantat induzierten Antikörper. Danach scheinen die mit den porcinen Inselzellen reagierenden Antikörper in den posttransplantationem gewonnenen Rattenserum Gewebe-spezifisch zu sein.

**Tabelle 2:** Nachweis der Gewebespezifität der Serumantikörper nach xITX; Serum der Wistar Ratte A76 mit *Kurzzeitfunktion* der mpLI; indirekte Immunfluoreszenz mit porzinem Gewebe; Nachweis von IgG und IgM; insgesamt wurden n=3 Seren getestet.

**Serumantikörper gegen porzines Pankreasgewebe**

Detektor	Anti-Ratten IgG		Anti-Ratten IgM	
	Serum 1:2	Negative Kontrolle (kein Serum)	Serum 1:2	Negative Kontrolle (kein Serum)
Serum der Ratte A76 Nach xITX				
Azinuszellen	+++	--	+ / ++	----
Gefäßendothel	++++	(+)	++	----
Gewebemakrophagen	++++	(+)	++	----
Inselzellen	++++	----	++	----

**Serumantikörper gegen porzines Nierenparenchym**

Detektor	Anti-Ratte IgG		Anti-Ratte IgM	
	Serum 1:2	Negative Kontrolle (kein Serum)	Serum 1:2	Negative Kontrolle (kein Serum)
Serum der Ratte A76 Nach xITX				
Tubuli	++++	----	+	----
Endothel der Glomeruli	++++	----	(+)	----
Nierenparenchymzellen	----	----	----	----

**Serumantikörper gegen porzines Herzmuskelgewebe**

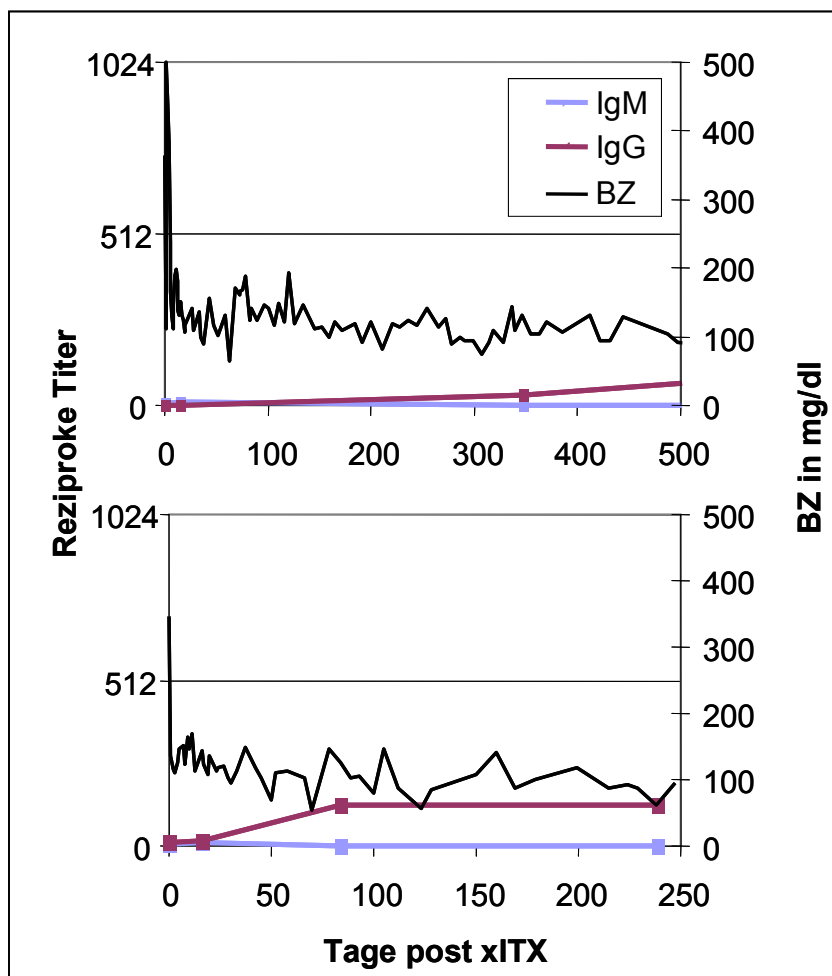
Detektor	Anti-Ratte IgG		Anti-Ratte IgM	
	Serum 1:2	Negative Kontrolle (kein Serum)	Serum 1:2	Negative Kontrolle (kein Serum)
Serum der Ratte A76 Nach xITX				
Kapillaren	+++	----	----	----
große Gefäße	++++	(+)	(+)	(+)
Herzmuskelzellen	----	----	----	----

**Serumantikörper gegen porzines Leberparenchym**

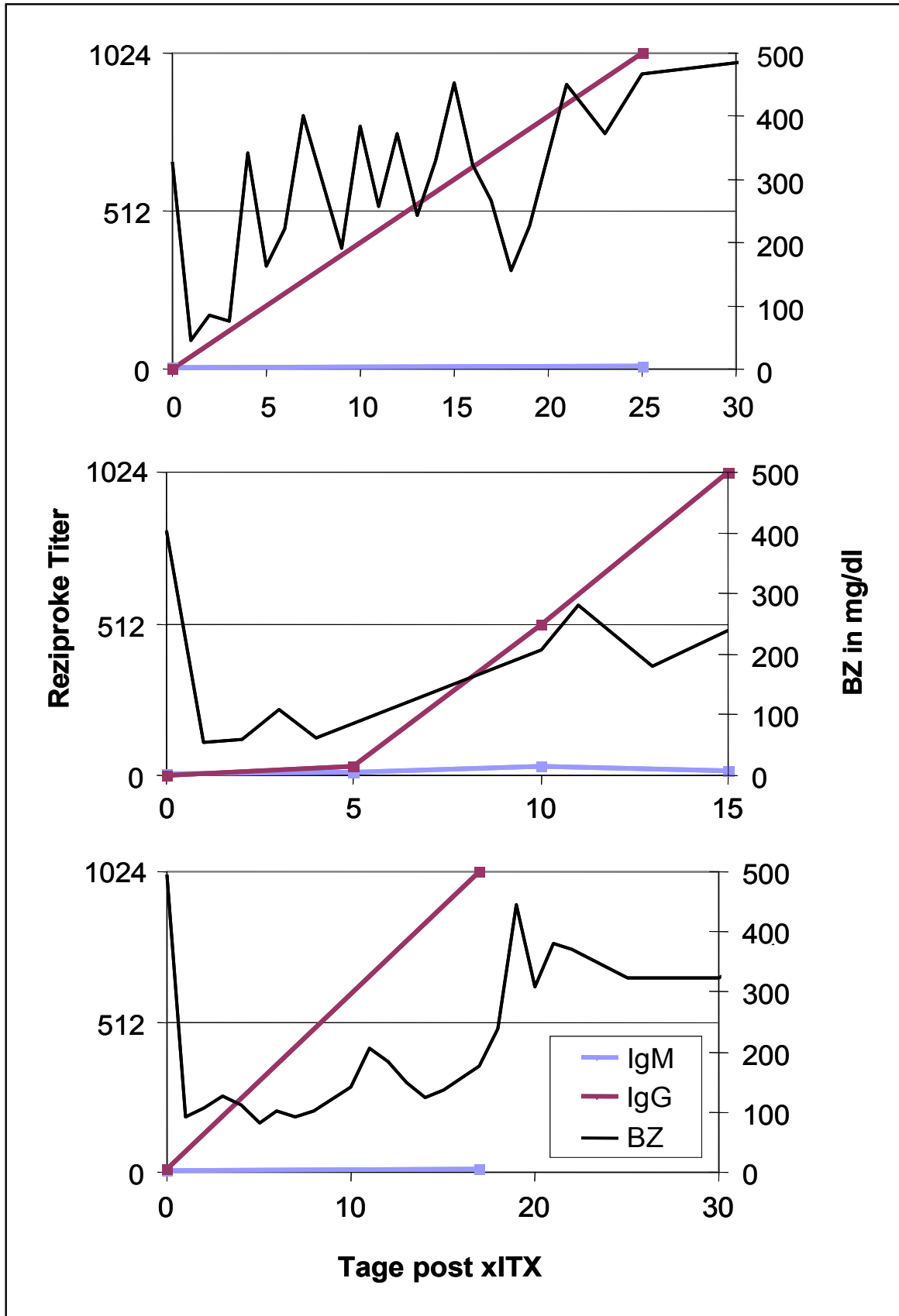
Detektor	Anti-Ratte IgG		Anti-Ratte IgM	
	Serum 1:2	Negative Kontrolle (kein Serum)	Serum 1:2	Negative Kontrolle (kein Serum)
Serum der Ratte A76 Nach xITX				
große periportale Gefäße	++++	(+)	+ / ++	----
Endothelien der Vasa sinusoidea	+++	----	----	----
Hepatozyten	----	----	----	----

#### 4.9 Zeitlicher Verlauf der Antikörpertiter nach Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Dauer der mpLI-Funktion in transplantierten Wistar Ratten und der Höhe der Antikörpertiter besteht. Solange normale Blutzuckerspiegel gemessen wurden, wurde von einer uneingeschränkten mpLI-Funktion ausgegangen. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen einen solchen Zusammenhang: Bei den normoglykämischen Wistar Ratten A33 und A75 mit *Langzeitfunktion* ihrer mpLI erfolgt nur ein mäßiger IgG Titeranstieg von 1:2 auf 1:128 über einen Zeitraum von 250 bzw. 500 Tagen (IgM bleibt negativ), während bei den drei hier dokumentierten Wistar Ratten mit *Kurzzeitfunktion*, A76, A81 und A114, die Anti-pLI-IgG Titer innerhalb von 26 Tagen auf Werte von 1:1.024 hochschnellten. Diese hohen Antikörpertiter korrelieren mit dem Anstieg des Blutzuckers auf hyperglykämische Werte.



**Abb. 16:** IgG Titer gegen pLI und Blutzuckerwerte von zwei Wistar Ratten mit *Langzeitfunktion* nach mpLI-Transplantation; die linke y-Achse stellt die reziproken Titer dar, die rechte y-Achse die Blutzuckerwerte (mg/dl); oben: Wistar Ratte A33, unten: Wistar Ratte A75.

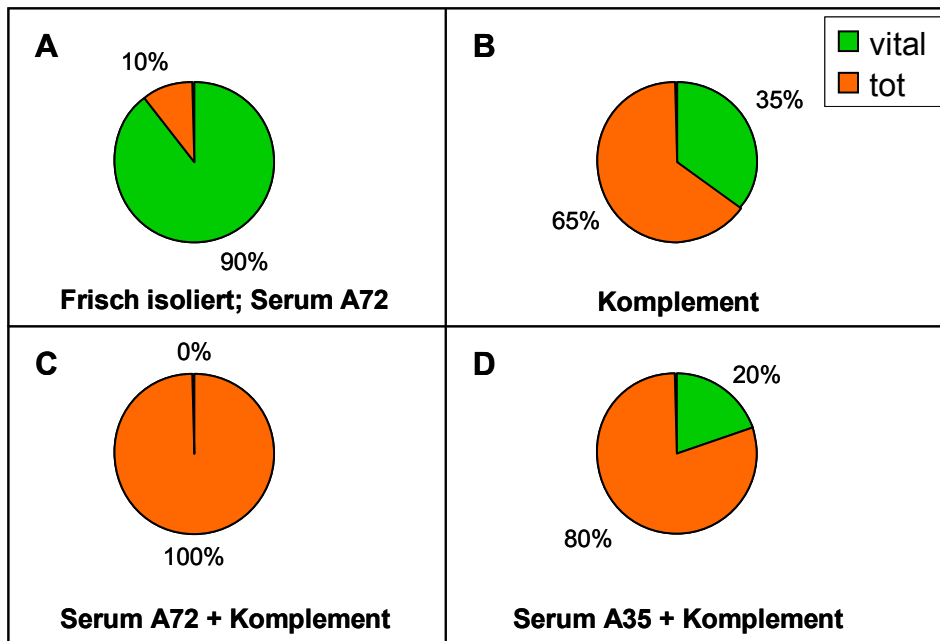


**Abb. 17:** IgG Titer gegen pLI und Blutzuckerwerte von drei Wistar Ratten mit *Kurzzeitfunktion* nach mpLI-Transplantation; die linke y-Achse stellt die reziproken Titer dar, die rechte y-Achse die Blutzuckerwerte (mg/dl); oben: Wistar Ratte A81; Mitte: Wistar Ratte A114; unten Wistar Ratte A76.

## 4.10 Zytotoxizität der Transplantat-induzierten Antikörper

### 4.10.1 Unverkapselte porcine Langerhans-Inseln

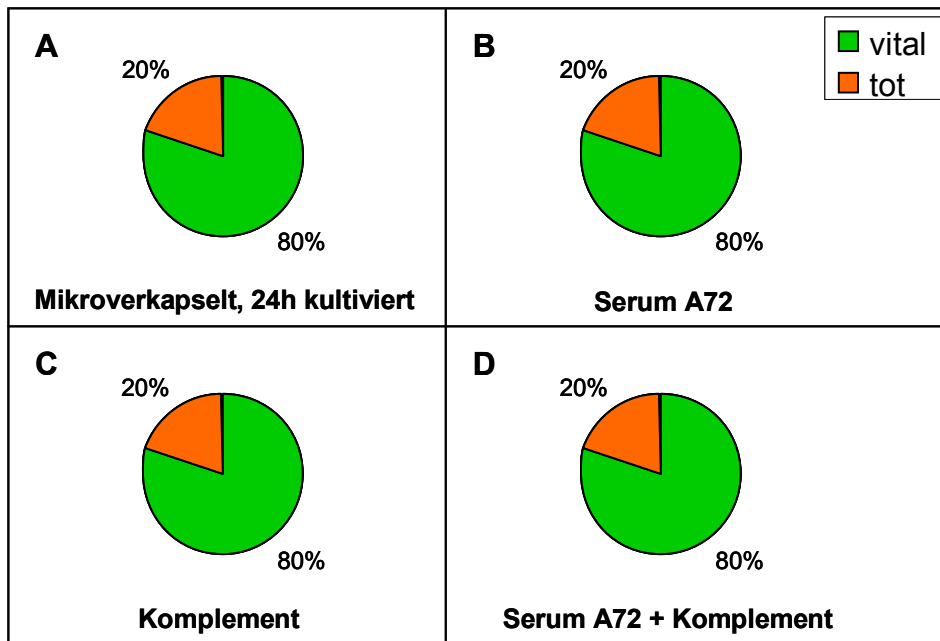
Da von IgG und IgM bekannt ist, dass sie Komplement aktivieren [60], sollte die Zytotoxizität der gegen pLI gerichteten, induzierten Antikörpern aus hochtitrigen Seren transplantiert Ratten gegenüber frisch isolierten, unverkapselten pLI in der indirekten Immunfluoreszenz getestet werden. Um den klassischen Weg der Komplement-Aktivierung zu testen, wurden frisch isolierte pLI, deren Vitalität zu Beginn des Versuchs geschätzte 90% betrug, mit unverdünntem Rattenserum für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend, für eine weitere 30-minütige Inkubation, das 4-fache Volumen Ratten-Komplement hinzugefügt (s. Kapitel 3.2.4). Anschließend wurde der Prozentsatz toter Zellen in den pLI fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Als Kontrollen dienten pLI, die nur mit Komplement (ohne Testserum; alternativer Weg der Komplement-Aktivierung), bzw. nur mit dem Testserum (ohne Komplement) inkubiert wurden. Abbildung 18 dokumentiert diese Versuche mit unverkapselten pLI schematisch. Diese Darstellung musste ersatzweise gewählt werden, da die Mikroskopkamera zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen defekt war; wie bei allen vorherigen Versuchen wurden die Präparate unabhängig voneinander von einer zweiten Person mikroskopisch evaluiert: Die alleinige Zugabe eines hochtitrigen Komplement-inaktivierten Testserums (von Ratte A72, A76, A81 oder A114; alle mit *Kurzzeitfunktion* der mpLI-Transplantate) senkt die Vitalität nicht, sie beträgt wie bei den frisch isolierten pLI unverändert ca. 90% (Abb. 18A beispielhaft für A72). Die alleinige Zugabe von Ratten-Komplement senkt die Vitalität der frisch isolierten pLI von 90% auf 35% (Abb. 18B). Nach Zugabe des 4-fachen Volumens Ratten-Komplement sinkt die Vitalität von 90% auf nahezu 0% (Abb. 18C beispielhaft für A72). Verwendet man aber anstelle des hochtitrigen ein niedrigtitriges Testserum aus Ratten mit *Langzeitfunktion* (Ratte A35), so fällt der Vitalitätsverlust mit ca. 80% etwas geringer aus (Abb. 18D); d.h. hier sind immerhin noch ca. 20% der Inselzellen vital.



**Abb. 18:** Zytotoxizität von Seren aus Ratten mit mpLI-Transplantaten gegenüber frisch isolierten (unverkapselten) pLI. Die Vitalität der frisch isolierten pLI beträgt zunächst ca. 90% (A); ihre Vitalität bleibt unverändert, wenn sie nur mit dem hochtitrigen, Komplement-inaktivierten Testserum A72 inkubiert werden (ebenefalls A); sie sinkt jedoch bereits auf 35%, wenn die pLI mit Ratten-Komplement inkubiert werden (B; alternativer Weg der Komplement-Aktivierung); sie sinkt auf 0% nach Inkubation mit dem Testserum A72 plus Komplement (C); sie sinkt jedoch lediglich auf 20%, wenn anstelle des hochtitrigen das niedrigtitrige Testserum des Tieres A35 mit *Langzeitfunktion* verwendet wird (D).

#### 4.10.2 Mikroverkapselte porzine Langerhans-Inseln

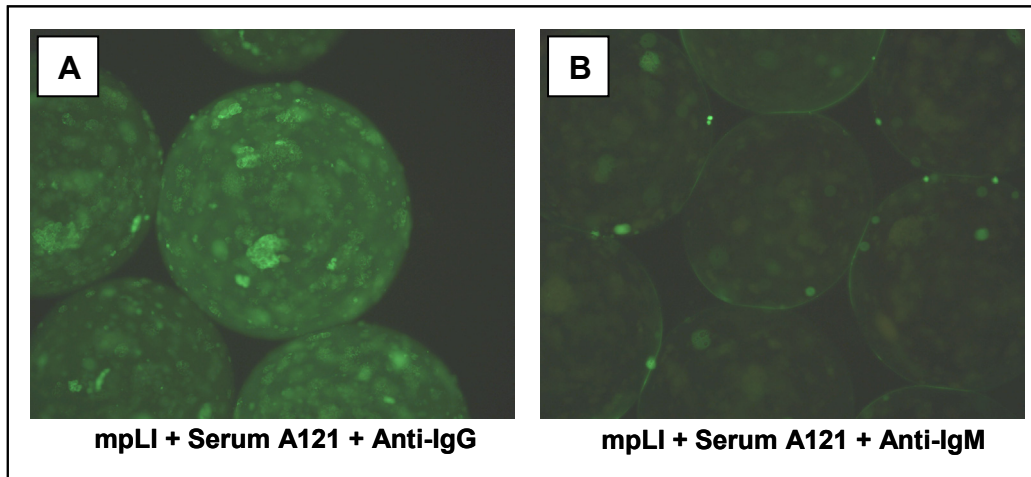
Essentiell ist die Frage, ob die Mikrokapseln aus Barium-Alginat die Zerstörung der pLI verhindern können, und ob klassische und/oder alternative Komplement-Aktivierung überhaupt stattfinden. Unter Verwendung von pLI, die 24 Stunden zuvor mikroverkapselt wurden, erfolgte der Versuchsablauf wie in Kapitel 4.10.1 mit dem hochtitrigen Testserum A72. Die Vitalität der mikroverkapselten pLI ist aufgrund der Verkapselungsbelastung und der längeren Kulturzeit stets etwas geringer und betrug zu Beginn der Versuche geschätzte 80%. Abbildung 19 repräsentiert beispielhaft das Ergebnis eines von zwei identisch verlaufenen Versuchen mit den Seren A72 und A76: Weder die Inkubation in dem hochtitrigen Testserum A72 (Abb. 19B), noch der Zusatz des 4-fachen Volumens Komplement allein (Abb. 19C) oder zum Testserum (Abb. 19D) verändern die Ausgangsvitalität der pLI in den Mikrokapseln, d.h. Serum und/oder Komplement können die mikroverkapselten Inselzellen nicht erreichen und somit nicht zerstören.



**Abb. 19:** Zytotoxizität von Seren aus Ratten mit mpLI-Transplantaten gegenüber mikroverkapselten pLI. Die Vitalität mikroverkapselter und für 24h *in vitro* kultivierter pLI beträgt zu Beginn der Untersuchung ca. 80% (A); die Vitalität der pLI in den Mikrokokapseln wird weder durch die Inkubation im hochtitrigen, Komplement-inaktivierten Testserum A72 (B), Komplement (C) oder Testserum A72 plus Komplement (D) beeinträchtigt, d.h., die Vitalität der Zellen beträgt unverändert geschätzte 80%.

#### 4.11 Permeabilität der Mikrokokapseln für IgG und IgM

Mit dem Versuch in Kapitel 4.10.2 blieb offen, ob Antikörper und/oder Komplementfaktoren die Kapselbarriere überwinden können. Es war daher die Frage zu klären, ob die Mikrokokapseln aus Barium-Alginat für IgG und gegebenenfalls auch IgM durchlässig sind. Dazu wurden mpLI in den Seren A35, A72, A76 und A121 – in geometrischer Verdünnungsreihe – inkubiert und anschließend mit den sekundären Anti-Rat-IgG und Anti-Rat-IgM Antikörpern inkubiert (s. Kapitel 3.2.5). Abbildung 20 dokumentiert das Ergebnis: Inkubation der mpLI mit den hochtitrigen Rattenserum alleine erzeugte keine Grünfärbung der mikroverkapselten Inselzellen (Daten nicht gezeigt); die pLI in den Kapseln leuchten stark grün nach Inkubation mit dem Serum A72 plus Anti-Rat-IgG Antikörper (Abb. 20A), nicht jedoch nach Inkubation mit dem Serum A72 plus Anti-Rat-IgM Antikörper (Abb. 20B). Leere Mikrokokapseln, d.h. die Alginatmoleküle per se, binden weder IgG noch IgM (Daten nicht gezeigt); die Grünfärbung der mikroverkapselten Zellen unter Zuhilfenahme des Anti-IgG Antikörpers bricht, wie auf den Gefrierschnitten, erst beim Titer von 1:4.096 ab. Mit dem Anti-Rat-IgM Antikörper wurden lediglich einzelne Zellen am Rand der Kapsel, oder Inselfragmente, die aus der Kapsel herausragten, grün gefärbt, nicht jedoch pLI im Kapselinneren. Demnach können IgG, nicht aber IgM die Barriere aus Barium-Alginat passieren.



**Abb. 20:** Inkubation von Leerkapseln mit Anti-Rat IgG, bzw. Anti-Rat IgM; keine Fluoreszenz (nicht gezeigt); Inkubation mpLI mit dem Serum A121; keine Fluoreszenz (nicht gezeigt); **A.** Inkubation von mpLI mit dem Serum A121 und Anti-Rat IgG; deutliche Fluoreszenz der verkapselten Zellen; **B.** Inkubation von mpLI mit dem Serum A121 und Anti-Rat IgM; lediglich eine geringe Fluoreszenz in der Peripherie der Mikrokapselfen.



## 5 Diskussion

Trotz erheblicher Fortschritte bei der experimentellen xenogenen Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln, gibt es immer noch gravierende Unterschiede in der Funktionsdauer der Transplantate im Empfänger, die überwiegend ungeklärt sind. Vorausgesetzt, es würden nur optimale Inseltransplantate übertragen, d.h. Transplantate von hoher Reinheit und Vitalität, und nur solche Transplantate, die vollständig durch eine Barium-Alginat-Kapsel vom Immunsystem des Empfängers getrennt sind, dann dürfte die Funktionsdauer der Transplantate nur geringfügig divergieren. In unserer Arbeitsgruppe wurde jedoch beobachtet, dass 59% Transplantate *in vivo* ihre Funktion zwischen Tag +2 und Tag +20 (*Kurzzeitfunktion*) post transplantationem verlieren, andere Transplantate (31,8%) dagegen, die diese kritische Phase über den 20. Tag post transplantationem überdauerten, teilweise lange anhaltende Funktion (*Langzeitfunktion*) zeigten. Bislang gibt es nur theoretische Erwägungen, wie die Abstoßung nach xITX ablaufen könnte [59, 69-72], detaillierte Untersuchungen zur humoralen Immunantwort nach Transplantation mikroverkapselter adulter porziner Langerhans-Inseln lagen zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht vor; auch die zellvermittelte Immunantwort wird in diesem Modell in einer zweiten Doktorarbeit ebenfalls genauer analysiert [73].

### **Natürliche präformierte Antikörper und Antikörper nach xenogener Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln**

Vor Beginn der eigentlichen Analysen war zunächst zu klären, ob die Transplantatempfänger stets die gleichen messbaren immunologischen Voraussetzungen erfüllen. Es galt die Frage zu beantworten, ob Wistar Ratten bereits vor Xenotransplantation in einem erheblichen Maße natürliche präformierte Antikörper gegen porzine Inselzellen aufweisen. Im Kapitel 4.1 wurde gezeigt, dass die potentiellen Transplantat-Empfänger vor Transplantation keine oder nur äußerst geringe IgG und IgM Titer gegen pLI (1:2 bis 1:4) aufwiesen. Die geringen Titer sind erklärbar, da es sich beim Modell *Schwein-auf-Ratte* um ein konkordantes Transplantationsmodell handelt [74]; hierzu passt, dass in unserem Modell bislang keine hyperakute, durch natürliche präformierte Antikörper ausgelöste Abstoßungsreaktion, die innerhalb von Minuten bis Stunden nach Transplantation auftritt, beobachtet wurde (siehe Kaplan-Mayer Kurve Kap. 3.1.2, Abb.1). Die zunächst beobachtete *primary non function* unverkapselter Transplantate war eindeutig auf eine mangelhafte Transplantat-Vitalität zurückzuführen und keine Folge des

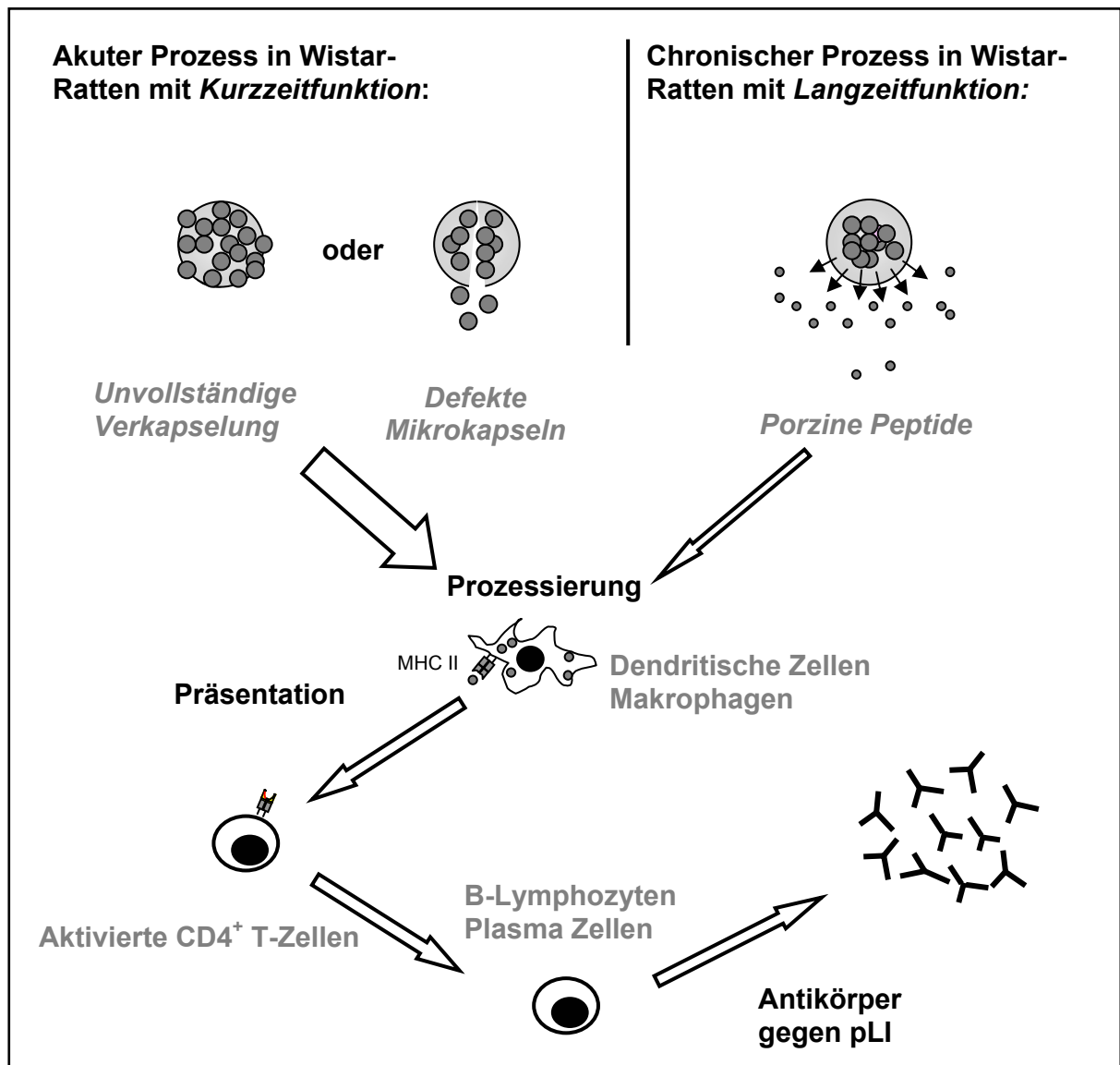
Angriffs natürlicher zytotoxischer Antikörper auf die artfremden Zellen. Mit größerer Erfahrung des Isolierungsteams, und damit stark verbesserter Vitalität, wurde die *primary non function* nicht mehr beobachtet. Simenovic beschrieb, dass nach Transplantation unverkapselter porziner Langerhans-Inseln in Mäuse deren natürliche xenoreaktive Antikörper gegen porzine Inseln keine Bedeutung für die Abstoßung hatten; es wurde auch keine hyperakute Abstoßung beobachtet, obwohl Antikörper vom IgM Typ gegen pLI vor Transplantation existierten; allerdings war die Höhe der IgM Titer bei diesen Untersuchungen offenbar unbekannt [72]. Auch Korsgren et al. beschrieben natürliche präexistente IgM Antikörper der Ratte gegen porzine Inselzell-Cluster [65].

Im nächsten Schritt wurden die Seren von Wistar Ratten nach Transplantation mit unverkapselten porzinen Langerhans-Inseln untersucht. Hier zeigten sich starke Titeranstiege sowohl für IgG (1:4.086) als auch für IgM (1:64) (vgl. Abb. 3a und 3b). Korsgren et al. fanden 12 Tage nach Transplantation von unverkapselten *fetal porcine islet like cell clusters* (ICC) in STZ-diabetischen Lewis-Ratten signifikant erhöhte IgG Spiegel gegen ICC, jedoch keinen Anstieg der IgM Spiegel [65,75]. Dass Korsgren et al. keine erhöhten IgM Spiegel messen können, dürfte mit der Wahl des Untersuchungszeitpunktes nach Transplantation zusammenhängen; denn am Tag +12 nach Transplantation hatte sich vermutlich der *class switch* von IgM nach IgG bereits vollzogen, so dass IgM am Tag +12 nicht mehr nachweisbar waren [60]. Hinweise auf einen *class switch* konnten wir beispielsweise bei der Ratte A115 (Sensibilisierung mit unverkapselten pLI) oder bei A121 (*Kurzzeitfunktion*) beobachten. Die IgM Antikörper waren in beiden Fällen überdurchschnittlich hoch, die IgG Antikörper hingegen noch vergleichsweise niedrig. Die Blutentnahme erfolgte am Tag +5 (A115) und am Tag +3 (A121). Bemerkenswert ist, dass Korsgren keine vermehrten IgG- und IgM-Präzipitate auf den explantierten porzinen Inselzell-Clustern fand [65]. Untersuchungen hierzu werden in unserer Arbeitsgruppe folgen.

Nach Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln wurden bei Wistar Ratten mit *Kurzzeitfunktion* hohe Antikörpertiter (sowohl IgG als auch IgM), bei Wistar-Ratten mit *Langzeitfunktion* jedoch nur mäßige Antikörpertiter (sowohl IgG als auch IgM) gegen pLI nachgewiesen. Hier wird erstmalig gezeigt, dass die Mikroverkapselung mit Barium-Alginat die Bildung von Antikörpern gegen pLI im Vergleich zur Transplantation unverkapselter pLI drastisch senken kann. Wir vermuten, dass die Bildung der Anti-Inselzellantikörper (hier IgG)

über den indirekten Weg der T-Zellaktivierung (mit nachfolgender T-Zell-abhängiger B-Zellaktivierung) erfolgt. So könnten porcine Peptide von *antigen presenting cells* (APC: MHC-Klasse-II<sup>+</sup>, dendritische Zellen und Makrophagen) des Empfängers aufgenommen, prozessiert und den Empfänger-eigenen T-Zellen präsentiert werden. Die mittels weiterer Signale aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzieren die Zytokine Interleukin 4 (IL-4), IL-5 und IL-6, die ihrerseits B-Lymphozyten zur Proliferation und zur Antikörperbildung anregen [69-71]. Der direkte Weg der T-Zellaktivierung über Spender MHC Klasse II Moleküle scheint in unserem Fall ausgeschlossen zu sein, da APC in den pLI durch Kurzzeitkultur zerstört werden, wie dies von Bretzel et al. am Beispiel isolierter Langerhans-Inseln der Lewis Ratte gezeigt wurde [76], ebenso wie durch eigene Arbeiten [77]. Zum anderen ist bei optimalen Transplantaten der Zell-Zell-Kontakt durch die Barriere aus Barium-Alginat nicht möglich, so dass die MHC Klasse II Moleküle des Spenders von den CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Empfängers nicht direkt erkannt werden können [59, 69-70].

Bei optimalen Transplantaten dürften die zellulären Mechanismen der Transplantatabstoßung, sofern eine Aktivierung stattgefunden hat, aufgrund der vollständigen Immunisolation nicht wirksam werden. Bei suboptimalen Transplantaten (unvollständig verkapselt oder zerstörte Kapseln) würden lediglich die wenigen direkt zugänglichen Zellen zerstört werden. Die Mehrzahl aller mikroverkapselten pLI bliebe aber unbehelligt. Offen aber bleibt die Rolle der natürlich vorhandenen wie auch neu gebildeten Antikörper, solange nicht geklärt ist, ob sie die Alginat-Barriere überwinden können.



**Abb. 21:** Hypothese zur indirekten T-Zellaktivierung durch porcine Peptide; *links oben:* unvollständige Kapseln und defekte Mikrokapselfn setzen größere Mengen xenogener Peptide frei, wodurch  $CD4^+$  T-Zellen aktiviert werden; *rechts oben:* optimal mikroverkapseltes Inseltransplantat, das nur geringfügig artfremde Antigene freisetzt.

### Differenzierung der IgG Isotypen

Die IgG Isotypen unterscheiden sich durch den Isotyp-spezifischen und konstanten Fc-Anteil, der für ihre funktionellen Eigenschaften von Bedeutung ist. Es zeigte sich, dass der Hauptbestandteil der IgG Fraktion in Wistar Ratten nach Transplantation von mPLI dem Isotyp IgG2a angehört, wobei IgG1 und IgG2b ebenfalls im Serum der Tiere, wenn auch in sehr viel geringeren Mengen, nachweisbar waren. Über die Funktion der Isotypen bei der Ratte gibt es noch keine gesicherten Daten. Die Gruppe um Professor Groth, Stockholm, beschrieb, dass sich die natürlichen xenoreaktiven Anti-Schwein-Antikörper des Menschen hauptsächlich dem IgM

und IgG2 Typ zuschreiben ließen, wobei diabetische Patienten, die fetale porzine Inselzellen erhalten hatten, IgG1 und IgG3 bildeten [78]. Simeonovic et al. haben gezeigt, dass Mäuse nach Transplantation porziner (unverkapselter) Inselzellen ebenfalls IgG1, IgG2a und IgG2b Antikörper gegen das Transplantat bilden, jedoch keine IgG3 Antikörper [72, 79]; eine Titer-Bestimmung wurde bislang weder nach Transplantation verkapselter noch unverkapselter Langerhans-Inseln vorgenommen. Die Gruppe um Professor Groth stellte fest, dass nach Transplantation von porzinen Inselzell-Clustern im menschlichen Serum neben IgG2 und IgM Antikörpern gegen das Gal $\alpha$  Epitop noch 6-8 Jahre nach Transplantation xenoreaktive IgG1 Antikörper gegen „non- Gal $\alpha$  Epitope“ nachweisbar waren, wobei diese vor Transplantation, im Gegensatz zu den Anti-Gal $\alpha$  Antikörpern, nicht vorhanden waren [80]; möglicherweise sind diese Antikörper gegen das/die gleiche(n) Epitop(e) auf porzinen Inselzellen gerichtet, wie die von uns nachgewiesenen Antikörper. Um jedoch genauere Aussagen zur Funktion unserer IgG-Antikörper machen zu können, bedurfte es weiterführende Untersuchungen (s.u.).

### **Antikörper gegen das Gal $\alpha$ Epitop**

Bevor die Seren von Wistar-Ratten nach Transplantation von pLI in der indirekten Immunfluoreszenz auf ihre Bindung an porzine Inselzellen untersucht wurden, wurden sie mit verschiedenen Konzentrationen Galaktobiose präinkubiert. Galaktobiose entspricht in seiner Struktur dem Gal $\alpha$  Epitop [67-68, 81]. Dadurch sollte erreicht werden, dass mögliche Anti-Gal $\alpha$  Antikörper im Rattenserum komplexiert wurden. Wären solche Antikörper vorhanden, müsste die Fluoreszenzreaktion auf den Langerhans-Inseln der Pankreasschnitte deutlich schwächer ausfallen als ohne Präinkubation. Das Ergebnis (s. Abb. 10) deutet aber darauf hin, dass die Wistar Ratten nach xITX keine Anti-Gal $\alpha$  Antikörper gegen porzine Langerhans-Inseln bilden; die von uns nachgewiesenen Antikörper richten sich folglich gegen andere porzine Epitope. Unsere Nachweisttechnik liefert zwar nicht den Beweis für das Fehlen dieser Antikörper; jedoch handelt es sich bei dem Modell *Schwein-auf-Ratte* um ein konkordantes Xenotransplantationsmodell, das dadurch definiert ist, dass sowohl Spender als auch Empfänger Gal $\alpha$  Epitope exprimieren [67,74]; die Zielstrukturen sind also vorhanden. Da die Gal $\alpha$  Epitope hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert werden [81-83], müsste es, vorausgesetzt Wistar Ratten bilden Anti-Gal $\alpha$  Antikörper, zu einer Autoimmunreaktion in den Empfängern kommen. Die aber wurde nie beobachtet.

Im Gegensatz zu Ratten exprimiert der Mensch keine Gal $\alpha$  Epitope [67], folglich bildet er Antikörper gegen das fremde Epitop. Diese Fähigkeit des Menschen ist im Laufe der Evolution entstanden und verschafft ihm einen Vorteil bei der Keimabwehr [67], denn Gal $\alpha$  Epitope werden auch auf den Hüllproteinen verschiedener Bakterien exprimiert [67]. Das Gen, welches für das Gal $\alpha$  Epitop kodiert, ist beim Menschen noch vorhanden, wird aber durch das Fehlen der  *$\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase* nicht exprimiert und deshalb als Pseudogen bezeichnet [67, 84]. Für die Keimabwehr ist dieses biologische Faktum vorteilhaft, für die Xenotransplantation vollständiger, vaskularisierter Organe jedoch ein zunächst unüberwindbares Problem, denn genau diese natürlichen, xenoreaktiven Antikörper sind die Ursache der hyperakuten Abstoßungsreaktion [68, 81]. Sandrin und McKenzie beschreiben, dass Gal $\alpha$  Epitope nicht auf allen Körperzellen exprimiert werden, so offenbar auch nicht auf den Inselzellen des Schweins [67, 82-83, 85-86]. Um sicher zu gehen, untersuchten wir jedoch die Langerhans-Inseln unserer Spenderschweine, ob diese vor oder nach *In-Vitro*-Kultur Gal $\alpha$  exprimierten. Dies geschah unter Zuhilfenahme von FITC-gekoppeltem Lektin I von *Griffonia simplicifolia*, denn dieses Lektin bindet selektiv nur an Gal $\alpha$  [87-88]. Wir konnten das Ergebnis anderer Arbeitsgruppen bestätigen, da das FITC-gekoppelte Lektin I nur an die Pankreasgänge, die großen Gefäße, sowie die Gefäßkapillaren der Langerhans-Inseln im Pankreaspräparat bindet (siehe Abb. 11). Nach mehrtägiger *In-Vitro*-Kultur der pLI war keine Färbung der pLI mit dem FITC-gekoppelten Lektin zu erzielen; die porzinen Inseln auf den Objektträgern blieben dunkel. Deshalb gehen wir davon aus, dass vorkultivierte porzine Inselzell-Transplantate durch eine Gal $\alpha$ -vermittelte hyperakute Abstoßung nicht zerstört werden, wenn sie denn eines Tages in menschliche Typ I Diabetiker transplantiert würden. Korsgren et al. haben bereits in ähnlichen Versuchen mittels Lektin und einem monoklonalen Antikörper gegen Gal $\alpha$  nachgewiesen, dass pLI von adulten Schweinen im Gegensatz zu Inselzellen von fetalen Schweinen weniger Gal $\alpha$  exprimieren [89]. Hiermit würde sich auch erklären, warum im Serum von Diabetikern, die in Schweden zwischen 1990 und 1993 unverkapselte porzine Inselzell-Transplantate erhalten hatten, 30-50 Tage nach Transplantation und sogar noch 6-8 Jahre nach Transplantation sehr hohe Antikörpertiter gegen Gal $\alpha$  nachgewiesen wurden; hier hat vermutlich eine Sensibilisierung mit Gal $\alpha$  stattgefunden, da ausschließlich fetale porzine Langerhans-Inseln als Transplantate dienten [80]. Auch auf den Langerhans-Inseln neugeborener Schweine wurde in 30% aller Untersuchungen Gal $\alpha$  nachgewiesen [90]. McKenzie bewies in einer Versuchsreihe, dass Antikörpertiter gegen Gal $\alpha$  möglicherweise keine Bedeutung für den frühen Verlust der fremden endokrinen Pankreaszel-

len haben. Er fand, dass *knock-out*-Mäuse, bei denen das Gen für *α1,3-Galaktosyltransferase* ausgeschaltet wurde, diese somit Antikörpertiter gegen Galα produzieren konnten [67, 84], fetale porzine Inselzellen nicht abstießen (dies entspricht einem diskordanten Modell); auch einer Hyperimmunisierung dieser *knock-out*-Mäuse (Anti-Galα Titer >1:20.000) folgte keine Abstoßungsreaktion der fetalen porzinen Inseln. Nach Gabe eines polyklonalen Maus-anti-Schwein Serums i.p. wurde das Transplantat jedoch innerhalb von 4-5 Tagen komplett zerstört. Der indirekte Weg der T-Zellaktivierung (mit nachfolgender B-Zellaktivierung) wurde hier durch einen mAk gegen CD4 unterdrückt [92]. Wie auch wir, geht diese Gruppe davon aus, dass es neben Galα weitere Epitope auf den porzinen Inseln gibt, die für eine Antikörperbildung und den frühen Transplantatverlust unverkapselter pLI verantwortlich sein könnten.

### **Antikörper gegen porcines Insulin**

Vor der Zulassung von rekombinantem Insulin in den USA im Jahr 1982, wurde ausschließlich Rinder- oder Schweineinsulin zur Therapie des Diabetes mellitus verwendet. Diese xeno-genen Insuline wurden von den Patienten mehrheitlich sehr gut vertragen. Humanes und porcines Insulin unterscheiden sich im Aufbau ihrer Aminosäureketten nur an Position 30 der β-Kette. Hier ist ein Alanin (beim Menschen) durch ein Threonin (beim Schwein) ersetzt [92]. Dieser geringfügige Unterschied hat keine immunologische Bedeutung; auch bei der Herstellung rekombinanter Insulinanaloga werden gezielt Aminosäuren ausgetauscht, um so die Wirkungseigenschaften der Insulinanaloga (lange anhaltend, kurzzeitig wirksam, schnell wirksam, langsam wirkend) zu variieren [2]. Dagegen unterscheidet sich porcines Insulin vom Ratteninsulin in 4 Aminosäuren, eine in der α-Kette und 3 weitere in der β-Kette [92]. Möglicherweise führt dieser größere Unterschied der beiden Insuline dazu, dass das porcine Insulin in Wistar Ratten als Fremdartigen erkannt wird und folglich Antikörper dagegen gebildet werden. In unseren Untersuchungen wurden Seren von Wistar Ratten mit *Kurzzeitfunktion* vor ihrer Verwendung in der indirekten Immunfluoreszenz mit porcinem Insulin in verschiedenen Konzentrationen (0,0005mg/dl, 0,005mg/dl, 0,05mg/dl, 0,5mg/dl, 5mg/dl, 50mg/dl) präinkubiert. Würde es sich bei den von uns in Ratten nachgewiesenen Antikörpern um Antikörper gegen porcines Insulin handeln, müssten die Antikörper das Insulin binden und Antikörper-Antigen-Komplexe bilden, die in der indirekten Immunfluoreszenz nicht nachweisbar wären – das Fluoreszenzbild bliebe schwarz; zumindest jedoch müsste die Grünfärbung – gegenüber der unbehandelten Kontrolle – deutlich schwächer ausfallen. Mit keiner der o. g. Insulinkonzentrationen waren Unterschiede zwischen Experiment und Kontrolle zu beobachten; so muss

man davon ausgehen, dass Wistar Ratten nach Transplantation porziner Langerhans-Inseln keine Antikörper gegen porcines Insulin bilden. Auch aus der Literatur gibt es bislang keine Hinweise, dass Anti-Insulin Antikörper nach Transplantation porziner Inselzellen in Ratten gebildet werden.

### **Antikörper gegen SLA-I und SLA-II Moleküle**

Zunächst wurde untersucht, welche Zellen im porcinen Pankreas SLA-I und SLA-II Epitope exprimieren. Die Färbung mit monoklonalen Maus-anti-Schwein SLA-I/SLA-II Antikörpern ergab keine Färbung der porcinen Langerhans-Inseln, wie sie in der indirekten Immunfluoreszenz nach Transplantation porziner Langerhans-Inseln in Wistar Ratten mit *Kurzzeitfunktion* beobachtet wurden. Dieses Ergebnis signalisiert, dass bei der Transplantation isolierter Langerhans-Inseln keine SLA-I-/SLA-II-exprimierenden Zellen transplantiert werden; ob Inselzellen nach Transplantation aufgrund funktioneller Stimuli SLA-I/SLA-II verstärkt exprimieren, ist zur Zeit nicht bekannt [76]. In einem weiteren Versuch wurden zunächst Anti-SLA-I bzw. Anti-SLA-II Antikörper auf die porcinen Pankreasschnitte gegeben und erst dann die indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt; so würden beide Antikörper, die monoklonalen Maus-anti-SLA-I/SLA-II Antikörper, wie auch die unbekannt Antikörper im Serum der Ratten mit *Kurzzeitfunktion* der mpLI um die Bindungsstellen konkurrieren. Würde es sich bei den im Serum der Wistar Ratten befindlichen Antikörper um Anti-SLA-I/SLA-II Antikörper handeln, so wären die Bindungs-relevanten Epitope besetzt und die Fluoreszenz müsste im Vergleich zur Kontrolle deutlich schwächer ausfallen; eine mögliche Kreuzreaktion des sekundären Ziege-anti-Ratte IgG mit den monoklonalen Maus-anti-SLA-I/SLA-II Antikörpern wurde in Vorversuchen ausgeschlossen. Eine Abschwächung der Fluoreszenz war nicht erkennbar, so dass es sich sehr wahrscheinlich bei den Antikörpern gegen porcine Inselzellen nicht um Anti-SLA-I/SLA-II Antikörper handelt.

### **Spezies- und Organ-Spezifität der Antikörper**

Unbekannt war, ob die Antikörper im Serum der Wistar Ratten nach Transplantation von mpLI ausschließlich an ein Epitop (ggf. auch an mehrere) auf porcinen Langerhans-Inseln binden. Fraglich war, ob diese(s) Epitop(e) auch auf den Inselzellen anderer Spezies exprimiert wird (werden). Das Ergebnis unserer vergleichenden Untersuchungen mit humanen Inselzellen und Inselzellen der Ratte ist eindeutig: Die fraglichen Antikörper der Wistar Ratten binden weder an humane, noch von der Ratte stammende Inselzellen; mit anderen Worten, sie



sind offenbar Spezies-spezifisch gegen porcine Inselzellen gerichtet. Lanza et al. zeigten, dass STZ-diabetische Ratten nach Transplantation von Bioreaktoren, gefüllt mit Inselzellen des Schweins oder des Hundes, Antikörper gegen Inselzellen bildeten, die ebenfalls keine Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Spezies zeigten, jedoch mit verschiedenen Geweben, wie Niere, Leber und Milz reagierten. [93]. Wir untersuchten ebenfalls, ob die Antikörperrelevanten Epitope außer auf Inselzellen auch auf anderen Parenchymzellen des Schweins exprimiert werden. Nach unseren Ergebnissen kann eine Bindung an Nierenparenchym-, Herzmuskelzellen und Hepatozyten ausgeschlossen werden. Natürlich fanden wir eine Antikörperbindung auf allen porcinen Endothelien. So kommen die bindungsrelevanten Epitope nach unseren Untersuchungen offenbar ausschließlich auf den porcinen Langerhans-Inseln vor. Hier besteht also eine Diskrepanz zu anderen Autoren und damit Aufklärungsbedarf.

### **Zeitlicher Verlauf der Antikörpertiter**

Was die zeitlichen Titerverläufe angeht, scheinen Funktionsdauer der Transplantate und Antikörpertiter gut miteinander zu korrelieren. Bei Wistar Ratten mit *Langzeitfunktion* wurde ein sehr mäßiger Anstieg der Titer gegen porcine Inselzellen festgestellt, bei Wistar Ratten mit *Kurzzeitfunktion* hingegen ein rascher Anstieg auf hohe Werte. Der Kurvenanstieg verläuft nahezu synchron mit dem Anstieg des Blutzuckerspiegels auf hyperglykämische Werte. Offen blieb an dieser Stelle, ob das der Hinweis auf eine Antikörper-induzierte Abstoßungsreaktion ist, oder ob diese Reaktion parallel zur zellulären Immunantwort [73] abläuft.

### **Zytotoxizität Transplantat-induzierter Antikörper und Permeabilität der Langerhans-Inseln**

Iwata et al. sind der Überzeugung, dass nach einer Xenotransplantation die humorale Immunantwort, vermittelt durch Antikörper und Komplementfaktoren, eine weit größere Rolle für die Abstoßungsreaktion spielen als nach Allotransplantation [94]. Wir haben deshalb im Zytotoxizitätstest *in vitro* untersucht, ob es sich bei den Antikörpern gegen pLI um zytotoxische Antikörper handelt. Zu unverkapselten Inseln wurde zunächst Komplement-inaktiviertes Serum (aktive Komplementfaktoren werden zerstört) von Wistar Ratten mit einem hohen Antikörpertiter gegen pLI hinzugegeben: Die Vitalität der Inseln blieb unverändert hoch. In einem weiteren Schritt wurde Rattenserum mit aktiven Komplementfaktoren hinzugefügt: Nach kurzer Zeit waren keine vitalen Inseln mehr nachweisbar. Man muss deshalb davon ausgehen, dass es sich bei den Antikörpern gegen pLI im Serum von Wistar Ratten um zytotoxische

Antikörper handelt, die zusammen mit Komplementfaktoren (dies entspricht dem klassischen Weg der Komplementaktivierung) die pLI zerstören. Die alleinige Zugabe von Komplement resultierte jedoch bereits in 65% zerstörter pLI (dies entspricht dem alternativen Weg der Komplementaktivierung). Danach erfolgt die Zellzerstörung offenbar über beide Wege, den klassischen, wie auch den alternativen Weg der Komplement-Aktivierung. Die restlichen 35% bis zur vollständigen Zellzerstörung sind eindeutig ein Effekt der zytotoxischen Antikörper.

Wurde der Versuch in gleicher Weise mit mikroverkapselten pLI wiederholt, so blieben die zytotoxischen Effekte aus. Mit anderen Worten, die Alginat-Kapsel bietet eine komplette Barriere. Die mögliche Durchlässigkeit der Kapseln für IgG und IgM ist dabei ohne Konsequenz, da IgG und IgM per se nicht in der Lage sind, unverkapselte pLI zu lysieren. Permeationsversuche hatten gezeigt, dass IgG scheinbar problemlos ins Innere der Barium-Alginat-Kapseln diffundieren können, IgM jedoch nur an jene Zellen binden, die aus der Kapsel herausragen. Aufgrund dieser Untersuchung kann man die „Porengröße“ der Kapseln eingrenzen: Sie muss demnach grösser als 150kD sein, damit IgG passieren kann, und kleiner als 960kD, damit IgM ausgeschlossen wird [60, 95]; Der Komplementfaktor C1q, der eine Schlüsselfunktion in der Komplementaktivierung einnimmt, hat das Molekulargewicht 410kD; es ist zugleich das größte Molekül der terminalen Komplementkomponenten [95, 96]. Da wir auf Grund unserer Ergebnisse annehmen müssen, dass die entscheidenden Komplementfaktoren nicht die Kapselbarriere passieren können (sonst würden die pLI im Innern der Kapsel lysiert) müssen wir eine „Porengröße“ von mindestens 150kD und höchstens 410kD annehmen. Iwata et al. fordern, dass die ideale Kapsel kleinere Moleküle (<150kD) passieren lässt, Antikörper und Komplement jedoch ausschließt [94]. Lanza et al. zeigten, dass ihre Kapseln keine IgG-Antikörper hindurch ließen [95], doch nach unseren Erkenntnissen ist es unerheblich, ob IgG Antikörper die Kapselbarriere passieren, solange kein Komplement durch das Kapselmaterial hindurch zu den Inselzellen dringen kann. Darin stimmen wir mit der Edmonton-Gruppe überein, die in einer ähnlichen Versuchsanordnung an Stelle des Rattenkomplementes humanes Serum einerseits Hitze-inaktiviert und andererseits nativ an verkapselten porzinen fetalen Inseln getestet hat. Sie kamen zu einem ähnlichen Ergebnis: Ihre Kapseln – wie unsere – waren für IgG durchlässig, für humanes Komplement hingegen undurchlässig [97]. Auch Gray et al. beschrieben eine Zelllyse nach Inkubation von unverkapselten Inselzellen der Maus mit humanen Blut [98]. Alle diese Erkenntnisse, einschließlich jener von Iwata et al., wurden aus *In-vitro*-Versuchen gewonnen. Um aber die Frage nach der kompletten Verkapselung ab-

schließlich beantworten zu können, bedarf es intensiver *In-vivo*-Versuche zur Permeabilität und den daraus resultierenden immunologischen Konsequenzen. Jedenfalls haben Antikörper gegen pLI plus Komplement *in unserem Model* nicht, wie von R. Gill für mikroverkapselte Langerhans-Inseln generell behauptet, eine Schlüsselfunktion für das Transplantatversagen, bzw. die Zellzerstörung [59].

## 6 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur humoralen Immunantwort von Wistar Ratten nach Xenotransplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln mit dem weiteren Ziel angestellt, Erkenntnisse über die Abstoßungsmechanismen immunisolierter xenogener Gewebe zu gewinnen. Denn unverändert besteht die Vision, mit der Xenotransplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln eine alternative, die Lebenszeit und -qualität deutlich verbessernde Therapieoption für Typ I Diabetiker zu schaffen. Da bislang erst in Einzelfällen porzine Inseln in Menschen transplantiert wurden, gibt es keine gesicherten Aussagen darüber, wie das Immunsystem des Diabetikers auf mikroverkapselte porzine Insel-Transplantate reagiert. Unsere Untersuchungen am Modell *Schwein-auf-Ratte* haben hierzu teilweise ganz neue Erkenntnisse geliefert. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Nach Transplantation porziner Langerhans-Inseln in nicht immunsupprimierte Ratten werden erhöhte IgG und IgM Titer gegen die Spenderinseln nachgewiesen: Ratten mit *Kurzzeitfunktion* der Transplantate haben sehr viel höhere Titer als Ratten mit *Langzeitfunktion*. Antikörper, die sich gegen das von uns verwendete hochreine und biokompatible Alginat wenden, wurden nicht identifiziert.
- (2) Die Antikörper gehören hauptsächlich dem IgG2a Typ an, in geringeren Mengen auch dem IgG1 und IgG2b Typ. IgG3 und IgG4 wurden nicht untersucht.
- (3) Die Frage, gegen welche(s) Epitop(e) auf dem porzinen Pankreas sich die Transplantat-induzierten Antikörper richten, muss zunächst unbeantwortet bleiben. Allerdings konnten wir zeigen, dass sie sich nicht gegen das Gal $\alpha$  Epitop, porcines Insulin, *swine leukocyte antigen class I* oder *swine leukocyte antigen class II* als Zielstrukturen richten.
- (4) Die Antikörper gegen porcine Langerhans-Inseln sind offenbar Spezies-spezifisch, da sie weder an allogenes Pankreasgewebe der Lewis Ratte, noch an xenogenes humanes Pankreasgewebe binden. Sie sind offenbar auch Gewebe-spezifisch, da sie in der indirekten Immunfluoreszenz weder an porcines Nierenparenchym, Herzmuskelgewebe oder Leberparenchym binden.
- (5) Der Anstieg der Antikörpertiter steht mit der Transplantatfunktion in engem Zusammenhang, d.h. der Antikörpertiter-Anstieg verläuft nahezu zeitgleich zum Transplantatversagen, gemessen am Anstieg des Blutzuckerspiegels. Die Folgerung, dass die Antikörperbildung ursächlich für das Transplantatversagen ist, ist nach momentanem Kennt-

nisstand nicht zulässig, da parallel ablaufende zytotoxische Mechanismen noch nicht ausreichend erforscht sind.

- (6) Antikörper der Wistar Ratten gegen porcine Langerhans-Inseln aktivieren Komplement und lysieren so *in vitro* über den klassischen Weg der Komplementaktivierung unverkapselte porcine Langerhans-Inseln vollständig. Antikörper gegen pLI per se waren nicht in der Lage, vitale Inseln *in vitro* zu lysieren.
- (7) Die von uns verwendeten Barium-Alginat-Kapseln sind für IgG durchlässig, für IgM hingegen undurchlässig. Die Permeabilität der Kapseln spielt im Hinblick auf die Effektormechanismen der humoralen Immunantwort eine untergeordnete Rolle, da Mikrokapseln offenbar nicht für alle Komplementfaktoren durchlässig sind. Bei den Zytotoxizitätstests mit mikroverkapselten porcinen Langerhans-Inseln wurde nie eine Lyse der Insulin-produzierenden Zellen im Kapselinneren beobachtet.

Die hiesigen Erkenntnisse zur humoralen Immunantwort nach Xenotransplantation mikroverkapselter porciner Langerhans-Inseln sind zum überwiegenden Teil neu und bestätigen nur zu einem sehr geringen Teil die Ergebnisse anderer Autoren. Trotz allem sind weitere Untersuchungen *in-vivo* und *in-vitro* erforderlich, um erstens die Antikörper-Zielstrukturen zu identifizieren und zweitens um auszuschließen, dass die Antikörper das Transplantat indirekt schädigen (als Antikörper-Peptidkomplexe), bevor allgemeingültige Aussagen zur humoralen Immunantwort nach Xenotransplantation mikroverkapselter porciner Inseln möglich sind.

Die vorliegenden Daten sind ein wichtiger Schritt im Hinblick auf die spätere Xenotransplantation mikroverkapselter porciner Langerhans-Inseln auf den Menschen, mit dem Ziel der optimalen Diabetes-Therapie.

## 7 Literaturverzeichnis

1. G. Herold und Mitarbeiter: Innere Medizin, Kapitel IX Endokrinologie, Diabetes mellitus, (Auflage 2003), p. 576-610
2. E. Austenat, S. Semmler: Sonderdruck aus Harrison Innere Medizin 2, Kapitel 333 Diabetes mellitus, Deutsche Ausgabe der 15. Aufl. in Zusammenarbeit mit der Charité Berlin, ABW Wissenschaftsverlag GmbH Berlin. (Auflage 2002), p. 1-31
3. K. G. Alberti, Ü. Z. Zimmet, (1999): Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I: Diagnosis and classification of diabetes, provisional report of a WHO consultation. World Health Organization, Department on Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva, p. 1-59
4. The diabetes control and complications trial research group (1995): The effect of intensive diabetes therapy on the development and progression of neuropathy. *Ann Intern Med* 122: 561-568
5. S. Silbernagel, F. Lang (1998): Taschenatlas der Pathophysiologie, Thieme Verlag, p. 286-293
6. H. Lestradet, L. Popez, C. Hellouin de Menibus, F. Levavasseur, J. Besse, L. Billaud, F. Battistelli, P. Tric, F. Lestradet (1981): Long term study of mortality and vascular complications in vascular complications in juvenile-onset (type I) diabetes. *Diabetes* 30: 175-179
7. J. E. Tooke (1995): Microvascular function in human diabetes. A physiological perspective (review). *Diabetes* 44: 721-726
8. M. D. Davies (1986): Diabetic retinopathy, diabetes control and blood pressure. *Transplant Proc* 18: 1565-1568

9. M. Brownlee, A. Cerami, H. Vlassara (1988): Advanced glycolisation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complication. *N Engl J Med* 318: 1315-1321
10. The diabetes control and complications trial research group (1993): The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in the insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986
11. G. Tydén, J. Bolinder, G. Solders, C. Brattström, A. Tibell, C.-G. Groth (1999): Improved survival in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and end-stage diabetic nephropathy 10 years after combined pancreas and kidney transplantation. *Transplantation* 67: 645-648
12. P. Fiorina, A. Secchi (2002): The effects of pancreas transplantation on the course of secondary diabetic complications. *Graft* 5: 303-307
13. R. Landgraf (1996): Impact of pancreas transplantation on diabetic secondary complications and quality of life. *Diabetologia* 39: 1415-1424
14. M. Kedinger, K. Haffen, J. Grenier, R. Eloy (1977): In vitro culture reduced immunogenicity of pancreatic endocrine islets. *Nature* 270: 736-738
15. K. F. Federlin, H. Jahr, R. G. Bretzel (2001): Islet transplantation as treatment of type I diabetes: from experimental beginnings to clinical application. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: 373-383
16. A. O. Gaber, D. W. Fraga, C. S. Callicutt, I. C. Gerling, O. M. Sabek, M. Y. Malak (2001): Improved in vivo pancreatic islet function after prolonged in vitro islet culture. *Transplantation* 72: 1730-1736
17. P. E. Lacy, J. M. Davie, E. H. Finke (1979): Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24°C) and a single injection of ALS. *Science* 204: 312-313

18. R. P. Lanza, W. M. Kühtreiber, D. Ecker, J. E. Staruk, W. L. Chick (1995): Xenotransplantation of porcine and bovine islets without immunosuppression using uncoated alginate microspheres. *Transplantation* 59: 1377-1384
19. K. Jain, S. Asina, H. Yang, E. D. Blount, B. H. Smith, C. H. Diehl, A. L. Rubin (1999): Glucose control and long-term survival in biobreeding/worcester rats after intraperitoneal implantation of hydrophilic macrobeads containig porcine islets without immunosuppression. *Transplantation* 68: 1693-1700
20. R. P. Lanza, D. M. Ecker, W. M. Kühtreiber, J. P. Marsh, J. Ringeling, W. L. Chick (1999): Transplantation of islets using microencapsulation: studies in diabetic rodents and dogs. *J Mol Med* 77: 206-210
21. P. de Vos, C. van Hoogmoed, J. van Zanten, S. Netter, J. H. Strubbe, H. J. Busscher (2003): Long-term biocompatibility, chemistry, and function of microencapsulated pancreatic islets. *Biomaterials* 24: 305-12
22. L. Chaillous, S. Darquy, S. Maugendre, A. S. Rivereau, G. Reach, P. Sai (1996): Xenograft of porcine islets immunoprotected in hollow fibres reduce the incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 39: 523-529
23. J. F. Begemann, J. M. Pollok, P. M. Kaufmann, D. Kluth, C. E. Broelsch, X. Rogiers (1999): In vitro demonstration of survival and secretory function of islets of langerhans encapsulated with a membrane of tissue-engineered chondrocytes for immunoi-solation. *Transplant Proc* 31: 3250-3252
24. D. Brandhorst, H. Brandhorst, B. J. Hering, R. G. Bretzel (1999): Long-term survival, morphology and in vitro function of isolated pig islets under different culture conditions. *Transplantation* 67: 1533-1541
25. K. F. Federlin, R. G. Bretzel, B. J. Hering (1992): Experimental and clinical islet transplantation. Present status. *Zentralbl Chir* 117: 670-676



26. J. Mellert, B. J. Hering, X. Liu, D. Brandhorst, H. Brandhorst, M. Brendel, E. Ernst, D. Gamberg, R. G. Bretzel, U. T. Hopt (1998): Successful islet auto- and allotransplantation in diabetic pigs. *Transplantation* 66: 200-204
27. C. T. Spadella, S. A. Schellini, C. E. Bacchi (1998): Pancreas transplantation versus islet transplantation versus insulin therapy in the prevention of nephropathy in alloxan-induced diabetic rats. *Transplant Proc* 30: 327-329
28. M. D. Brendel, B. J. Hering, A. O. Schulz, R. G. Bretzel (2001): The International Islet Transplant Registry; Justus-Liebig-Universität, Giessen. Newsletter No. 9 und [www.med.uni-giessen.de/itr/newsletter](http://www.med.uni-giessen.de/itr/newsletter)
29. S. Moskalewski (1967): Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol* 5: 342-353
30. C. Ricordi, C. Socci, A. M. Davalli, C. Staudacher, P. Baro, A. Vertova, I. Sassi, F. Gavazzi, G. Pozza, V. di Carlo (1990): Isolation of the elusive pig islet. *Surgery* 107: 688-694
31. C. Ricordi, C. Socci, A. M. Davalli, C. Staudacher, A. Vertova, P. Baro, I. Sassi, S. Braghi, N. Guizzi, G. Pozza (1990): Application of the automated method for islet isolation in swine. *Transplant Proc* 22: 784-785
32. C. Ricordi, C. Rastellini (1995): Automated method for pancreatic islet separation. In: C. Ricordi (Ed). *Methods in Cell Transplantation*. R.G. Landes Company, Austin (USA); p. 433-438
33. F. Pattou, J. Kerr-Conte, C. Hober, M. C. Vantyghem, J. Petit, J. Lefebvre, C. Proye (1995): Mass isolation of human islets of Langerhans favored by the prior development of a semiautomatic technique in the pig model. *Transplant Proc* 27: 1751-1752
34. P. R. V. Johnson, S. A. White, N. J. London (1996): Collagenase and human islet isolation. *Cell Transplant* 5: 437-452

35. D. Brandhorst, H. Brandhorst, M. Brendel, R. G. Bretzel (1988): Problems of islet isolation from the human and porcine pancreas for islet transplantation into men. *Zentralbl Chir* 123: 814-822
36. D. Brandhorst, H. Brandhorst, B. J. Hering, K. Federlin, R. G. Bretzel (1995): Islet isolation from the pancreas of large mammals and humans: 10 years of experience. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103: 3-14
37. J. R. T. Lakey, G. L. Warnock, M. Bierton, Z. Ao, B. J. Hering, N. J. M. London, C. Ricordi, F. Corbin, R. V. Rajotte (1997): Development of an automated computer-controlled islet isolation system. *Cell Transplant* 6: 47-57
38. A. Ilieva, S. Yuan, R. N. Wang, D. Agapitos, D. J. Hill, L. Rosenberg (1999): Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interaction in the pancreas. *J Endocrinol* 161: 357-364
39. R. Calafiore, F. Calcinaro, G. Basta, M. Pietropaolo, A. Falorni, M. Piermattei, P. Brunetti (1990): A method for the massive separation of highly purified, adult porcine islets of Langerhans. *Metabolism* 39: 175-181
40. P. Marchetti, E. H. Finke, A. Gerasimidi-Vazeou, L. Falqui, D. W. Scharp, P. E. Lacy (1991): Automated large-scale isolation, in vitro function and xenotransplantation of porcine islets of Langerhans. *Transplantation* 52: 209-213
41. E. Finke, P. Marchetti, L. Falqui, C. Swanson, M. McLearn, B. Olack, D. Scharp, P. Lacy (1991): Large scale isolation, function, and transplantation of islets of Langerhans from the adult pig pancreas. *Transplant Proc* 23: 772-773
42. T. Yamaguchi, Y. Mullen, Y. Watanabe, Y. Nomura, D. Cass, C. Brunnicardi (1994): Isolation and function of islets from young adult pig pancreas. *Transplant Proc* 24: 1010-1012

43. P. Toomey, D. R. Chadwick, H. Contractor, P. R. Bell, R. F. James, N. J. London (1993): Porcine islet isolation: prospective comparison of automated and manual methods of pancreatic collagenase digestion. *Br J Surg* 80: 240-243
44. P. Marchetti, D. V. Scharp, K. Pfeiffner, C. J. Swanson, E. H. Finke, B. J. Olack, A. Gerasimidi-Vazeou, M. McClear, P. E. Lacy (1994): Cryogenic storage of isolated, purified porcine pancreatic islets. *Transplantation* 57: 340-346
45. R. Giannarelli, P. Marchetti, G. Villani, A. di Carlo, S. Cosimi, M. Andreozzi, L. Cruschelli, P. Masiello, A. Coppelli, R. Navalesi (1994): Preparation of pure, viable porcine and bovine islets by a simple method. *Transplant Proc* 26: 630-631
46. G. Villani, P. Marchetti, R. Giannarelli, L. Cruschelli, M. Andreozzi, S. Cosimi, R. Navalesi (1994): Comparison of different digestion techniques and density gradient purification procedures to prepare viable pancreatic islets from market age pigs. *Transplant Proc* 26: 621-622
47. L. Bühler, S. Deng, R. Mage, C. Bubloz, A. Rohner, P. Morel, (1994): Pig islet isolation: new aspects. *Transplant Proc* 26: 628-629
48. P. Prevost, E. Roland, C. Veriot, C. Collier, E. Muscat (1995): Large-scale isolation of porcine pancreatic islets: significant improvement of the process. *Transplant Proc* 27: 3396-3398
49. M. Miyamoto, K. Inoue, Y. Gu, T. Tun, W. Cui, I. Fujiwara, H. Ohyanagi, H. Hayashi, T. Yamazaki, H. Setoyama, Y. Kawakami, J. Ida, M. Kogire, M. Imamura, H. Iwata, Y. Ikada (1998): Improved large-scale isolation of breeder porcine islets: possibility of harvesting from nonheart-beating donor. *Cell Transplant* 7: 397-402
50. W. Cui, Y. Cu, M. Miyamoto, M. Tanaka, B. Xu, M. Imamura, H. Iwata, Y. Ikada, K. Inoue (1999): Novel method for isolation of adult porcine pancreatic islets with two-stage digestion procedure. *Cell Transplant* 8: 391-398

51. M. Krickhahn, C. Bühler, T. Meyer, A. Thiede, K. Ulrichs (2002): The morphology of islets within the porcine donor pancreas determines the isolation result: successful isolation of pancreatic islets can now be achieved from young market pigs. *Cell Transplant* 11: 827-838
52. J. Tollemar, C. G. Groth, O. Korsgren, A. Andersson, M. Blombäck, P. Olsson (1992): Injection of xenogeneic endocrine pancreatic tissue into the portal vein – effects on coagulation, liver function and hepatic hemodynamics. *Transplantation* 53: 139-142
53. K. Ulrichs, W. Hamelmann, C. Bühler, U. Beutner, T. Meyer, C. Otto, G. Klöck, A. Thiede (1999): Transplantation of porcine pancreatic islets for therapy of diabetes type I. The way to clinical application. *Zentralbl Chir* 124: 628-635
54. D. W. Gray, P. J. Morris (1987): The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. *Stain Technol* 62: 373-381
55. R. G. Bretzel, B. J. Hering, K. F. Federlin (1988): Assessment of adult islet preparations. In: C. Ricordi (Ed). *Methods in Cell Transplantation*. R.G. Landes Company, Austin (USA); p. 455-463
56. T. Meyer, S. Breuer, C. Bühler, A. Popel, U. Beutner, G. Klöck, A. Thiede and K. Ulrichs (2001): Cellular and humoral immune reactions in rats with long-term functioning microencapsulated porcine pancreatic islet grafts. *Xenotransplantation* 8 (1): 6
57. R. van Schilfgaarde, P. de Vos (1999): Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. *J Mol Med* 77: 199-205
58. J. Schrezenmeir, J. Kirchgessner, L. Gero, L. A. Kunz, J. Beyer, W. Mueller-Klieser (1994): Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islets organs. *Transplantation* 59: 1308-1314
59. R. G. Gill (2001): Use of small animal models for screening immunoisolation approaches to cellular transplantation. *Ann NY Acad Sci* 944: 35-46

60. C. A. Janeway, P. Travers (1997): Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage
61. W. Parker, S. Saadi, S. S. Lin, Z. E. Holzknacht, M. Bustos, J. L. Platt (1996) Transplantation of discordant xenografts: a challenge revisited. *Immunol Today* 17: 369-372
62. U. Galili (1993): Interaction of the natural anti-Gal antibody with the  $\alpha$ -galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* 14: 480-482
63. D. K. C. Cooper (1998): Xenoantigens and xenoantibodies (review). *Xenotransplantation* 5: 6-17
64. J. L. Platt (2000): Acute vascular reaction. *Transplant Proc* 32: 829-840
65. H. Krook, A. Hagberg, Z. Song, U. Landegren, L. Wennberg, O. Korsgren (2002): A distinct th1 immune response precedes the described th2 response in islets xenografts rejection. *Diabetes* 51:79-86
66. P. Grohn, A. Glock, J. Schmitt, U. Zimmermann, A. Horcher, I. Bretzel, B. J. Hering, D. Brandhorst, H. Brandhorst, T. Zekorn (1994): Large-scale production of Ba<sup>2+</sup>-alginate-coated islets of Langerhans for immunoisolation. *Exp Clin Endocrinol* 102: 380-387
67. U. Galili (1999): Evolution of  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase and of the  $\alpha$ -Gal Epitope. Chapter 1. In: U. Galili, J. L. Avila:  $\alpha$ -Gal and Anti-Gal  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase,  $\alpha$ -Gal Epitopes, and the Natural Anti-Gal Antibody. *Subcellular Biochemistry Volumen 32*, Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow
68. R. Oriol, Y. Ye, E. Koren, D. K. Cooper (1993): Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation* 5: 1433-1442

69. D. W. R. Gray (2001): An overview of the immune system with specific reference to membrane encapsulation and islet transplantation. *Ann NY Acad Sci* 944: 226-239
70. D. W. R. Gray (1997): Encapsulated islet cells: the role of direct and indirect presentation and the relevance to xenotransplantation and autoimmune recurrence. *Med Bull* 53: 777-788
71. R. G. Gill (1999): Antigen presentation pathways for immunity to islet transplants: relevance to immunoisolation. *Ann NY Acad Sci* 875: 255-260
72. C. J. Simeonovic (1999): Xenogeneic islet transplantation. *Xenotransplantation* 6: 1-5
73. S. Breuer (2004): Etablierung des Modells "Ratte-anti-Schwein" zur xenogenen Transplantation mikroverkapselter Langerhans-Inseln. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät, Würzburg (eingereicht)
74. J. L. Bracy, N. Cretin, D. K. C. Cooper, J. Iacomini (1999): Xenoreactive natural antibodies (Review). *Cell Mol Life Sci* 56: 1001-1007
75. O. Korsgren, A. C. Wallgren, M. Satake, A. Karlsson-Parra (1999): Xenograft rejection of fetal porcine islet-like cell cluster in the rat: effects of active and passive immunization. *Xenotransplantation* 6: 271-280
76. T. Zekorn, A. Horcher, U. Siebers, K. Federlin, R. G. Bretzel (1999): Synergistic effect of microencapsulation and immunoalteration on islet allograft survival in bioartificial pancreas. *J Mol Med* 77: 193-198
77. K. Ulrichs (1994): Pankreasinsel-Transplantation. *Immunologische Grundlagen*. Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart, Berlin, Köln
78. M. Kumagai-Braesch, M. Satake, Y Qian, J. Holgerson, E. Moller (1998): Human NK cell and ADCC reactivity against xenogeneic porcine target cells including fetal porcine islet cells. *Xenotransplantation* 5: 132-145

79. C. J. Simenovic, K. U. S. McKenzie, J. D. Wilson, J. C. Zarb, P. D. Hodgkin (1998): Role of anti-donor antibody in the rejection of pig proislet xenografts in mice. *Xenotransplantation* 5: 18-28
80. E. Lindeborg, M. Kumagai-Braesch, A. Tibell, E. Möller (2001): Continued production of xenimmune antibodies 6-8 years after clinical transplantation of fetal pig islet-like cell-clusters. *Xenotransplantation* 8: 273-283
81. M. S. Sandrin, H. A. Vaughan, P. L. Dabkowski, I. F. C. McKenzie (1993): Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal ( $\alpha$ 1-3)Gal epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11391-11395
82. I. F. McKenzie, P. X. Xing, H. A. Vaughan, J. Prenzowska, P. L. Dabkowski, M. S. Sandrin (1994): Distribution of the major xenoantigen (gal ( $\alpha$ 1-3)gal) for pig to human xenografts. *Transplant Immunol* 2: 81-86
83. U. Galili (1999): Evolution of  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase and of the  $\alpha$ -Gal Epitope. Chapter 13. In: M. Sandrin, I. F. C. McKenzie: Modulation of  $\alpha$ Gal Epitope Expression on Porcine Cells. *Subcellular Biochemistry Volumen 32*, Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow
84. U. Galili (1999): Evolution of  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase and of the  $\alpha$ -Gal Epitope. Chapter 3. In: D. H. Joziase, J. H. Shaper, N. L. Shaper: The  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase Gene. *Subcellular Biochemistry Volumen 32*, Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow
85. T. Kin, Y. Nakajima, Y. Aomatsu, H. Kanehiro, M. Hisanaga, S. Ko, T. Ohyama, H. Nakano (2000): Humoral human xenoreactivity against isolated pig pancreatic islets. *Surg Today* 30: 821-826
86. T. Kin, Y. Nakajima, H. Kanehiro, M. Hisanaga, Y. Aomatsu, T. Ohyama, K. Nishio, M. Sho, M. Nagao, T. Yamada, H. Nakano (1998): Humoral xenoreactivity in pig-to-human islet cell transplantation. *Transplant Proc* 30: 81-82

87. I. J. Goldstein, D. A. Blake, S. Ebisu, T. J. Williams, L. A. Murphy (1981): Carbohydrate binding studies on the *Bandeiraea simplicifolia* 1 isolectin. Lectins which are mono-, di-, tri- and tetravalent for N-acetyl-D-galactosamine. *J Biol Chem* 226:3: 3890-3893
88. U. Galili (1999): Evolution of  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase and of the  $\alpha$ -Gal Epitope. Chapter 6. In: I. J. Goldstein, H. G. Winter: *The Griffonia simplicifolia* I-B<sub>4</sub> Isolectin – A Probe for  $\alpha$ -D-Galactosyl End Groups. *Subcellular Biochemistry Volumen 32*, Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow
89. W. Bennet, A. Björkland, B. Sundberg, H. Davies, J. Liu, J. Holgersson, O. Korsgren (2000): A comparison of fetal and adult porcine islets with regard to gal[ $\alpha$ ](1,3)gal expression and the role of human immunoglobulins and complement in islet cell cytotoxicity. *Transplantation* 69: 1711-1717
90. G. R. Rayat, R. V. Rajotte, B. J. Hering, T. M. Binette, G. S. Korbutt (2003): In vitro und in vivo expression of Gal $\alpha$ (1,3)Gal on porcine islet cells is age dependent. *J Endocrinol* 177: 127-135
91. I. F. C. McKenzie, M. Koulmanda, T. E. Mandel, M. S. Sandrin (1998): Pig islet xenografts are susceptible to “anti-pig” but not gal $\alpha$ (1,3)gal antibody plus complement in gal o/o mice. *J Immunol* 161: 5116-5119
92. Eingabe der Stichworte „insulin, structure, animals“ im Internet:  
[www.providence.edu/chm/kcornly/Case%20-%20The%20Structure%20of%20insulin.pdf](http://www.providence.edu/chm/kcornly/Case%20-%20The%20Structure%20of%20insulin.pdf)
93. R. P. Lanza, A. M. Beyer, W. L. Chick (1994): Xenogeneic humoral responses to islets transplanted in biohybrid diffusion chambers. *Transplantation* 57: 1371-1375
94. H. Iwata, Y. Murakami, Y. Ikada (1999): Control of complement activities for immunisolation. *Ann NY Acad Sci* 875: 7-23



95. R. P. Lanza, R. Jackson, A. Sullivan, J. Ringeling, C. McGrath, W. Kühnreiber, W. L. Chick (1999): Xenotransplantation of cells using biodegradable microcapsules. *Transplantation* 67: 1105-1111
96. J. G. van den Tweel (1999): Immunologie – Das menschliche Abwehrsystem. Spektrum der Wissenschaft, Akademischer Verlag, Heidelberg, p. 50
97. G. R. Rayat, R. V. Rajotte, Z. Ao, G. Korbitt (2000): Microencapsulation of neonatal porcine islets: Protection from human antibody/complement-mediated cytolysis *in vitro* and long-term reversal of diabetes in nude mice. *Transplantation* 69: 1048-1090
98. L. Badet, T. Titus, E. Metzen, A. Handa, P. McShane, L.W. Chang, P. Giangrande, D. W. R. Gray (2002): The interaction between primate blood and mouse islets induces accelerated clotting with islet destruction. *Xenotransplantation* 9: 91-96

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Experimentellen Chirurgie und Transplantations-Immunologie in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik (Chirurgie I, Zentrum für Operative Medizin), die mich in allen praktischen und theoretischen Angelegenheiten meiner Arbeit stets intensiv unterstützte.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik (Chirurgie I, Zentrum für Operative Medizin), für die Überlassung des Arbeitsplatzes, sowie die finanzielle und technische Unterstützung meiner Arbeit aus Mitteln der Grundausstattung.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau I. Chodnevskaja, die mich bei allen serologischen und histologischen Arbeiten mit ihrer technischen Erfahrungen stets tatkräftig unterstützte.

Danken möchte ich auch Herrn U. Beutner, Ph.D., für seine Immunologie-Vorlesung, in der er besonders auf die Probleme der Transplantations-Immunologie einging. Er sorgte durch seine wissenschaftlichen Erfahrungen stets für kompetente Antworten auf meine Fragen und für Denkanstöße.

Im übrigen gilt mein besonderer Dank allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantations-Immunologie, die mir mit praktischer Hilfe und stets freundlich zur Seite stand.

Die vorliegende Arbeit entstand mit großzügiger finanzieller Unterstützung durch das IZKF Würzburg, Teilprojekt D3 und die Deutsche Bundesstiftung Umwelt.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Popel  
Vorname: Andreas  
Geburtsdatum: 7. August 1976  
Geburtsort: Selb  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung:**

1983 – 1987 Grundsule der Gemeinde Thiersheim  
1987 – 1996 Luisenburg-Gymnasium Wunsiedel

### **Zivildienst:**

09/1996 – 10/1997 Einsatz als Pflegediensthelfer in der Chirurgischen Ambulanz  
und Notaufnahme am Klinikum Fichtelgebirge, Marktredwitz

### **Studium:**

11/1997 – 5/2004 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-  
Universität, Würzburg  
09.09.1999 Physikum  
29.08.2000 I. Staatsexamen  
25.03.2003 II. Staatsexamen  
19.05.2004 III. Staatsexamen

### **Beruf:**

seit 07/2004 Assistenzarzt in der kardiologischen Abteilung  
am Klinikum Bayreuth, Lehrkrankenhaus der  
Universität Erlangen

Würzburg, im November 2004

  
Andreas Popel