

Relative Effekte von Gal⁺ und Gal^{low/-} porzinen hämatopoetischen Vorläuferzellen auf die Thrombozytenaggregation von Primaten und Endothelzellaktivierung: Implikationen für die Toleranzinduktion mittels hämatopoetischen Chimerismus im Schwein zu nicht-humanen Primatenmodell

Ch. Knosalla^(1,2), M. A. Giovino⁽³⁾, D. Harper⁽³⁾, E. Kaczmarek⁽⁴⁾, I. Schmitt⁽⁵⁾, B. Gollackner⁽¹⁾, R. Hetzer⁽²⁾, D. K. C. Cooper^{(1)*}, S. C. Robson^{(4)*}

⁽¹⁾Transplantation Biology Research Center, Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School, Boston ⁽²⁾Deutsches Herzzentrum Berlin ⁽³⁾Immerge BioTherapeutics, Charlestown ⁽⁴⁾Center for Immunobiology, Beth Israel-Deaconess Medical Center/Harvard Medical School, Boston ⁽⁵⁾Inst. f. Medizinische Immunologie, Universitätsklinikum Charité, Berlin (*Joint Senior Authors)

Ziel der Studie

Untersuchung der relativen Effekte von

1. Gal^{low/-} porzinen hämatopoetischen Vorläuferzellen
2. Gal⁺ Knochenmarkszellen (KM), und
3. Gal⁺ porzinen mobilisierten Vorläuferzellen des Blutes (PBPC) auf die Thrombozytenaggregation von Pavianen und die Endothelzellaktivierung von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC).

Methoden

Da Zellen von GT-knockout Schweinen zur Zeit für experimentelle Zwecke nicht zur Verfügung stehen, wurden entsprechend dem Protokoll von *Gojo et al.* Gal-negative Zellen aus dem Knochenmark von Gal⁺ Schweinen isoliert. Diese machen ca. 1% aller Knochenmarkszellen aus (*Abb.2*).

Porzine mobilisierte periphere hämatopoetische Vorläuferzellen (PBPC; Gal⁺) und mononukleäre Zellen des Knochenmarkes (KM; Gal⁺ oder Gal^{low/-}) wurden hinsichtlich ihres Potenzials zur (i) Induktion einer Aggregation von Pavianthrombozyten und (ii) der Aktivierung von Endothelzellen gemessen an der erhöhten Expression von vascular cell adhesion molecule (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und E-selectin an HUVEC ermittelt. Zusätzlich wurden PBPC, die mit einer α -Galactosidase behandelt wurden, untersucht.

Ergebnisse

Gal⁺ PBPC und Gal⁺ KM-Zellen (10^7) induzierten eine Aggregation von Pavianthrombozyten von 42 und 31%, während Gal^{low/-} KM-Zellen zu keiner Thrombozytenaggregation führten (*Abb. 3-5*).

Die α -Galactosidase Behandlung führte zu einer Reduktion der Thrombozytenaggregation im Vergleich zu nicht-behandelten (*Abb. 6*).

Gal⁺ PBPC und Gal⁺ KM-Zellen (10^7) führten zu einer erhöhten Expression von VCAM-1, ICAM-1- und E-selectin in HUVEC, während Gal^{low/-} KM-Zellen zu keiner erhöhten Expression führten (*Abb. 7-9*).

Hintergrund

Die erfolgreiche Xenotransplantation könnte das aktuelle Problem des Spendermangels ultimativ lösen. Dies scheint jedoch durch eine einfache Immunsuppression allein nicht realisierbar zu sein. Vielmehr scheint die Induktion einer immunologischen Toleranz unabdingbar zu sein. Ausgehend von der Induktion einer immunologischen Toleranz mittels gemischten

hämatopoetischen Chimerismus in MHC-mismatch Allotransplantationen bei nichthumanen Primaten, die zu einer stabilen Nierentransplantatfunktion ohne Immunsuppression über viele Jahre führte, haben wir Versuche unternommen eine xenogene Toleranz mittels hämatopoetischen Chimerismus im Schwein-zu-Primaten-Modell zu etablieren.

Die Induktion eines hämatopoetischen Chimerismus in präkonditionierte Paviane ist jedoch durch die Entwicklung einer thrombotischen Mikroangiopathie kompliziert (*Abb. 1*). Mittels Cloning ist es nun gelungen, Schweine zu generieren, die das Gen für die α -Galactosyltransferase (GT) nicht besitzen (sogenannte *GT-knockout Schweine*).

Standardprotokoll zur Entwicklung eines hämatopoetischen Chimerismus oder Toleranz im Schwein-zu-nicht-humanen-Primatenmodell

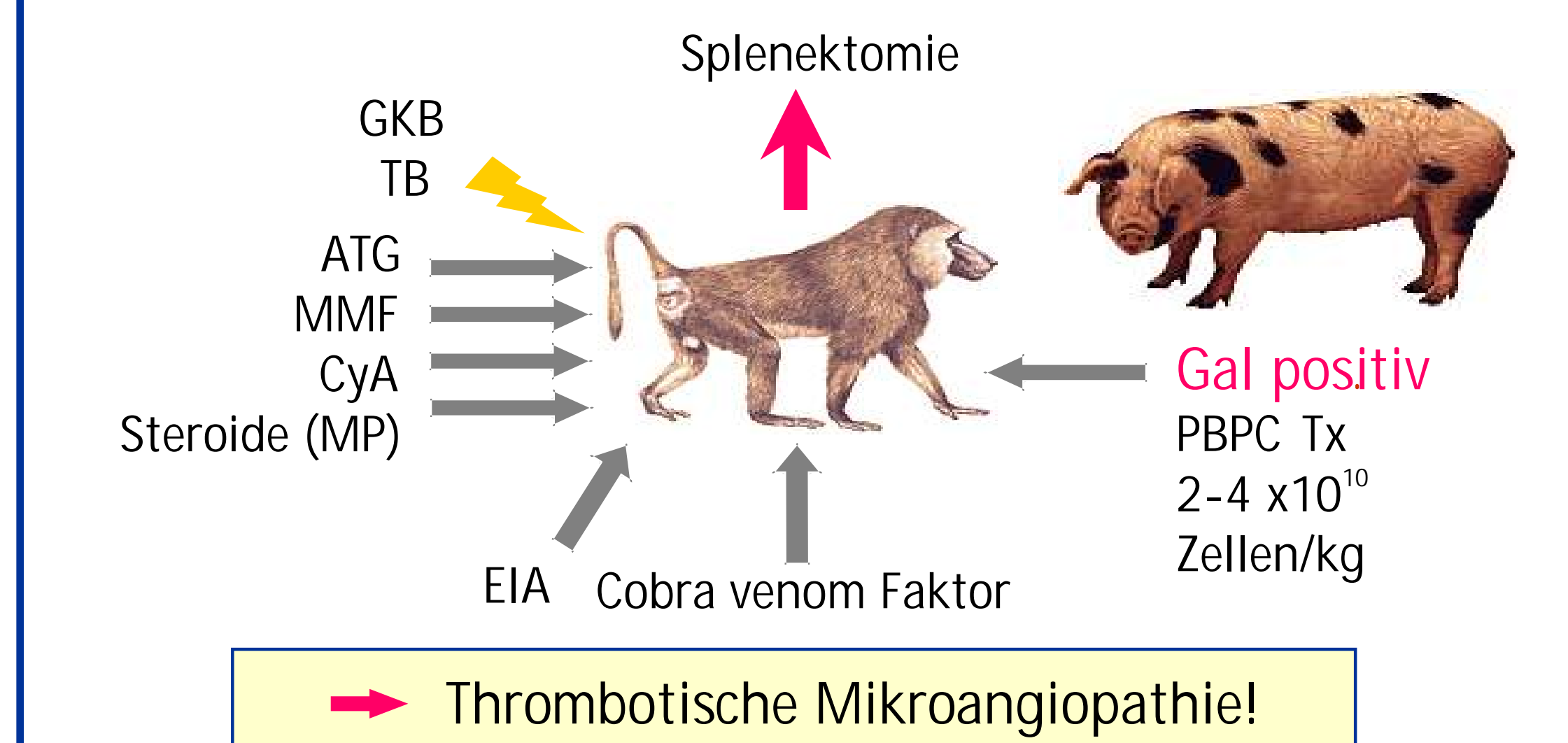


Abb. 1 PBPC = porcine mobilized peripheral blood progenitor; GKB = Ganzkörperbestrahlung; TB = Thymusbestrahlung

Isolierung von Gal⁺ KM-Zellen aus Gal⁺ Schweinen

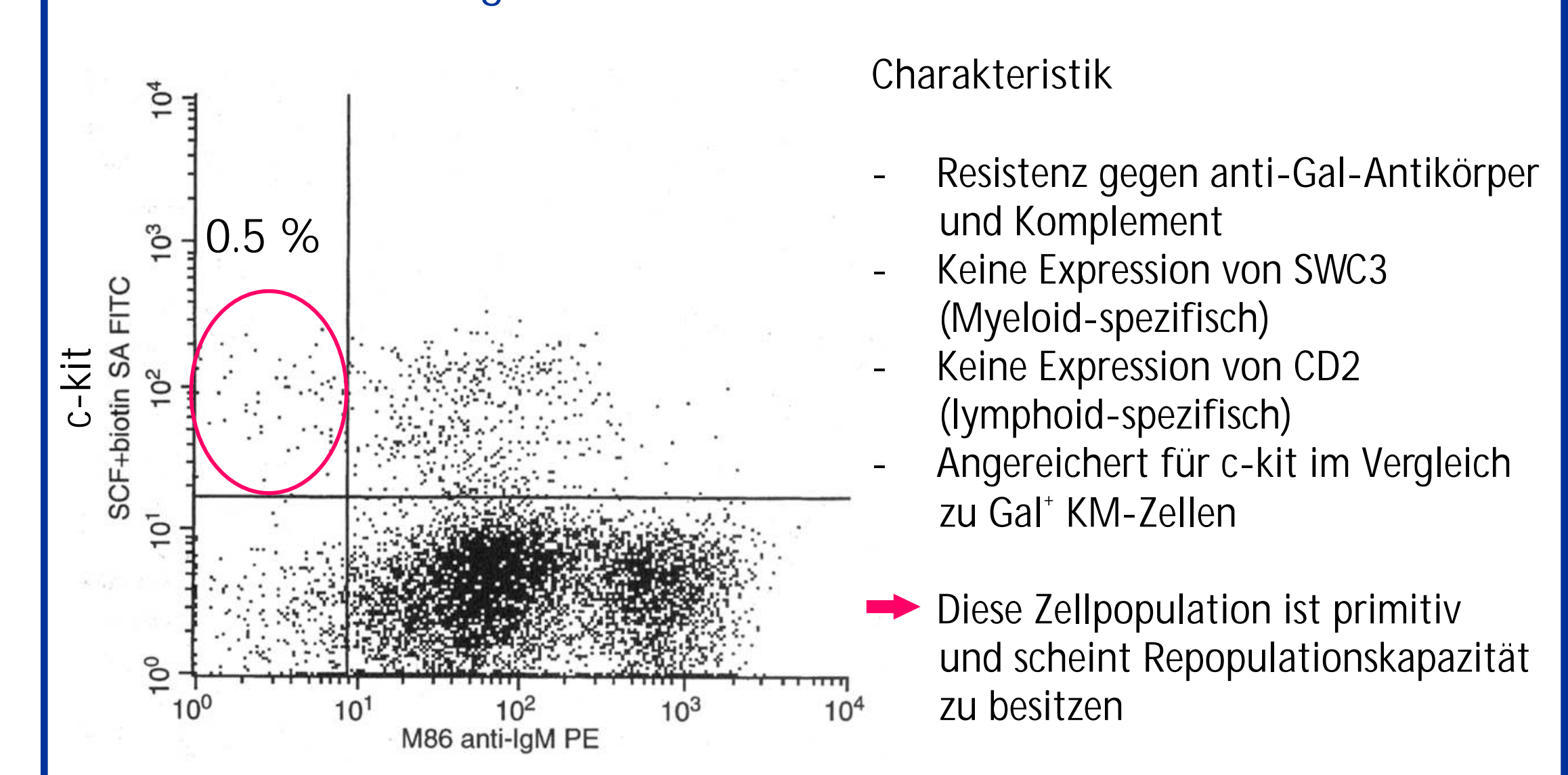


Abb. 2 Gojo et al. Xenotransplantation 2002;9:297-300

Effekte von Gal⁺ PBPC auf die Thrombozytenaggregation von Pavianen

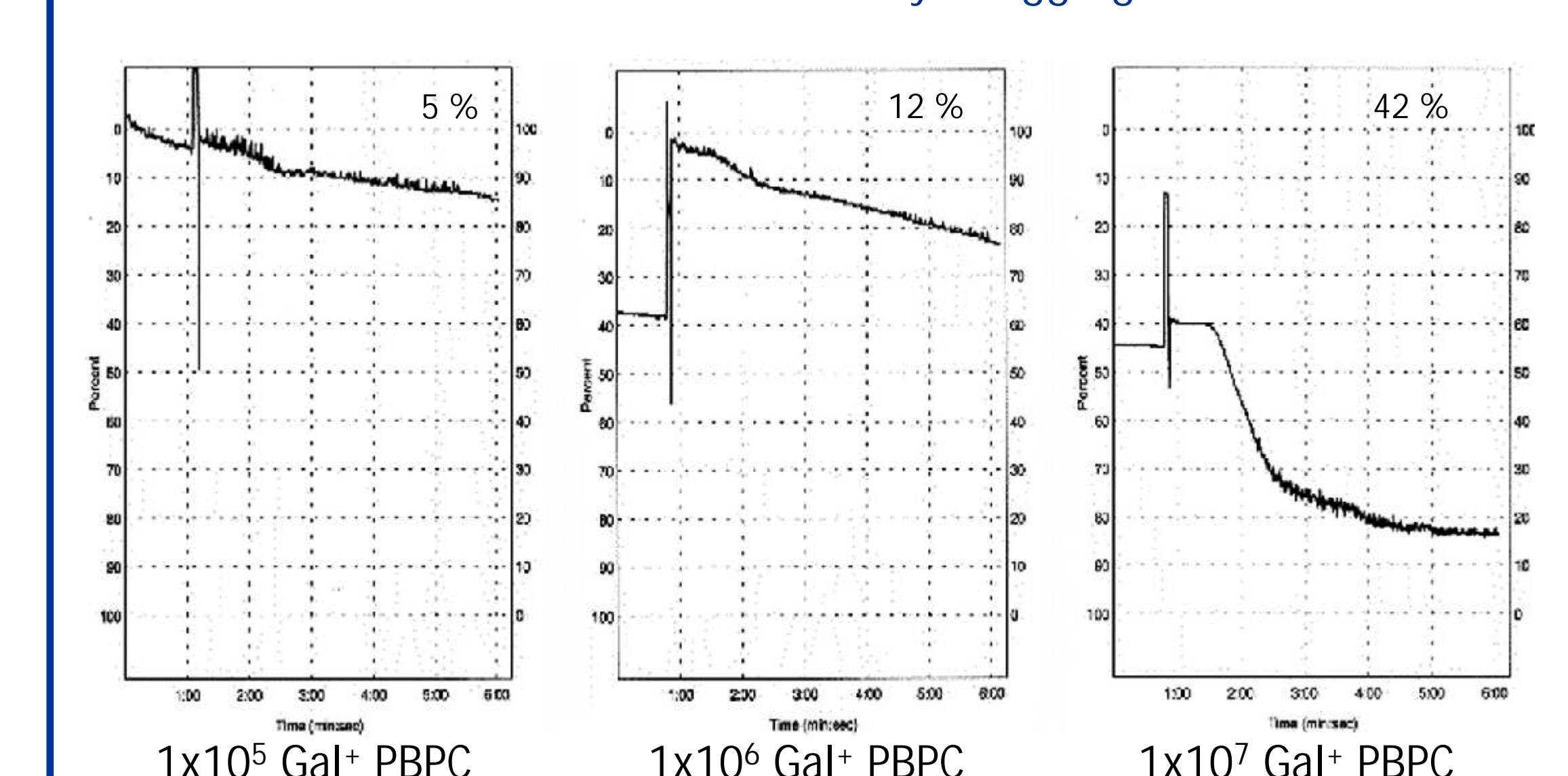


Abb. 3

Effekte von Gal⁺ KM-Zellen auf die Thrombozytenaggregation von Pavianen

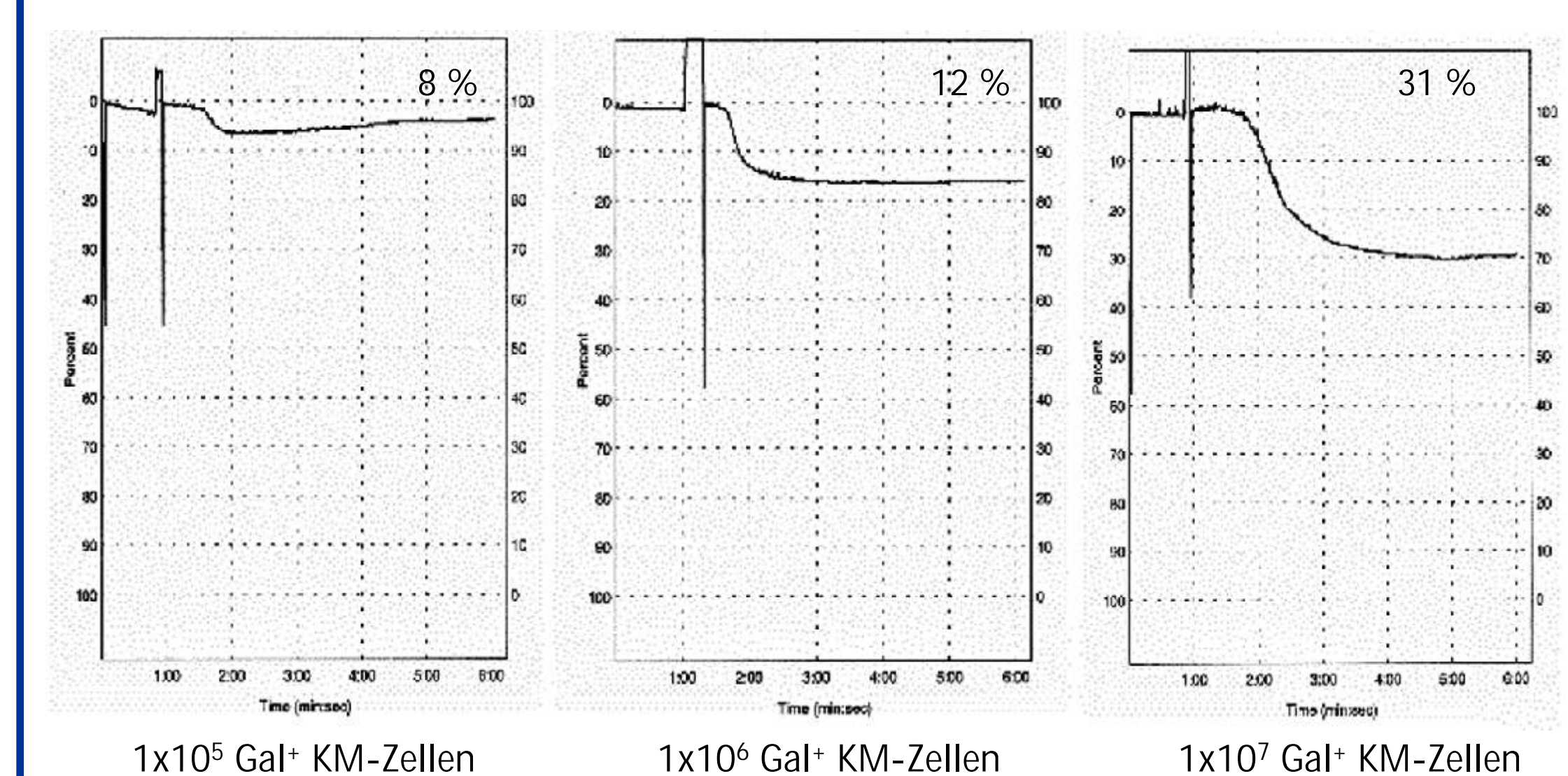


Abb. 4

Effekte von Gal^{low/-} KM-Zellen auf die Thrombozytenaggregation von Pavianen

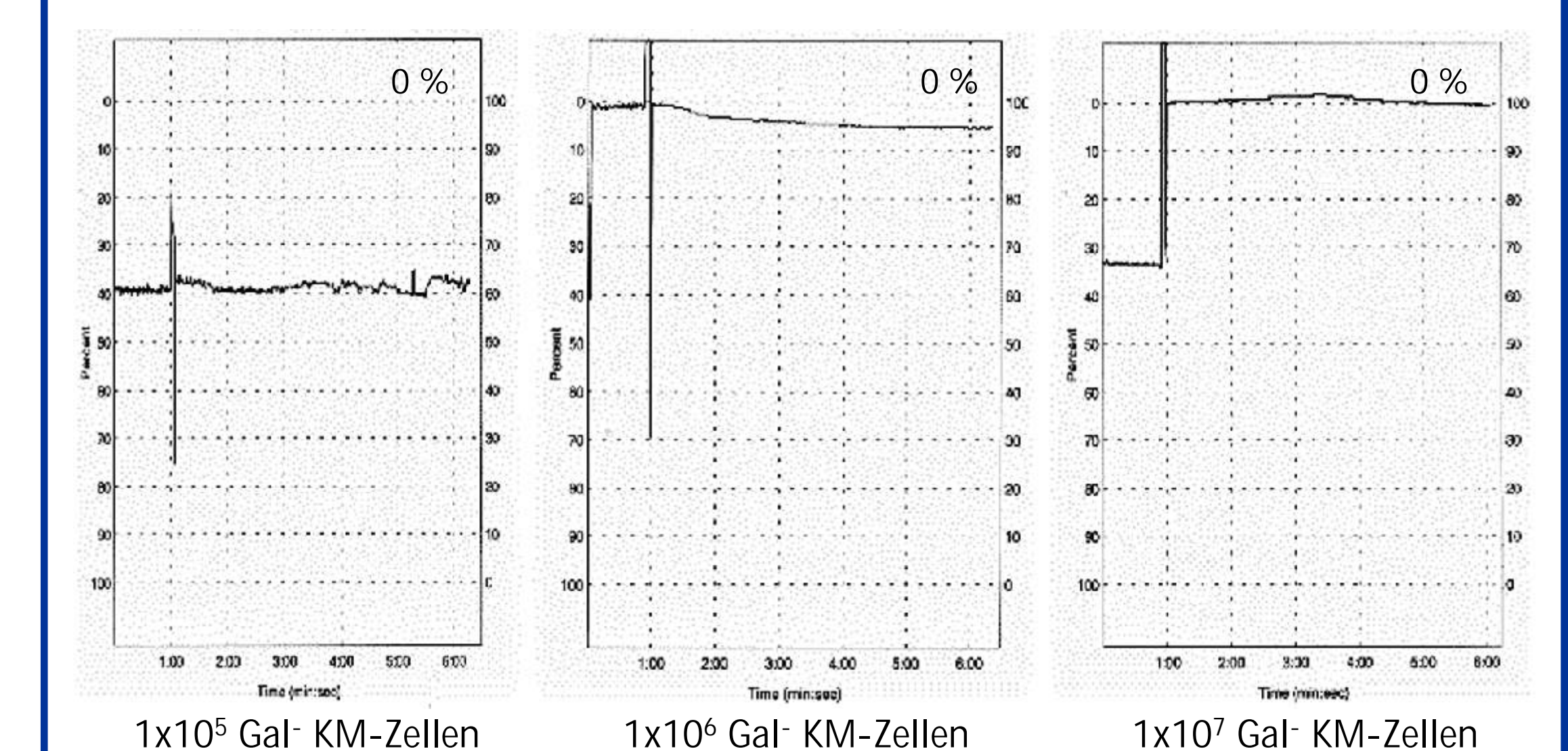


Abb. 5

Behandlung von PBPC mit α -Galactosidase

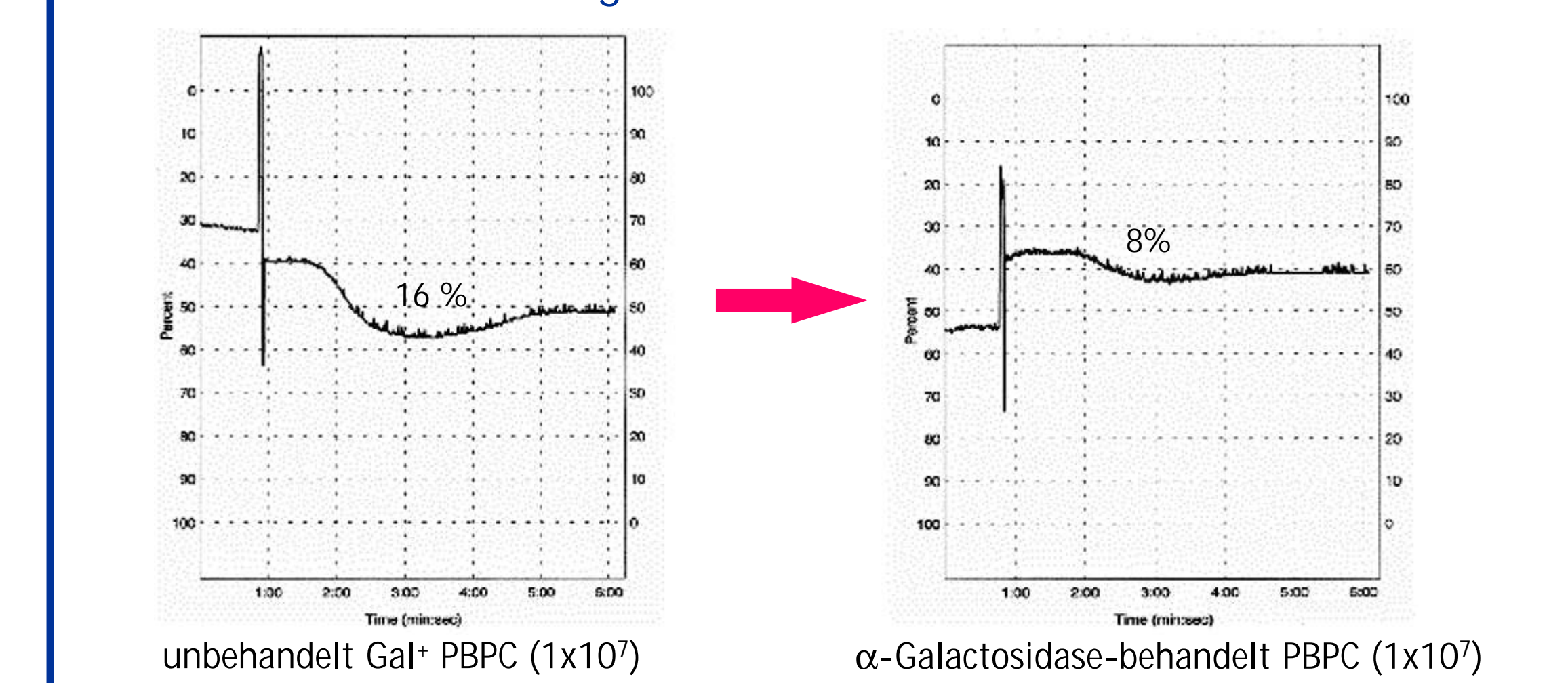


Abb. 6 α -Galactosidase-behandelte PBPC zeigten keine Thrombozytenaggregation in Konzentrationen bis zu 5×10^7 Zellen (nicht gezeigt) und 50% weniger Thrombozytenaggregation in einer Konzentration von 1×10^7

Expression von Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)

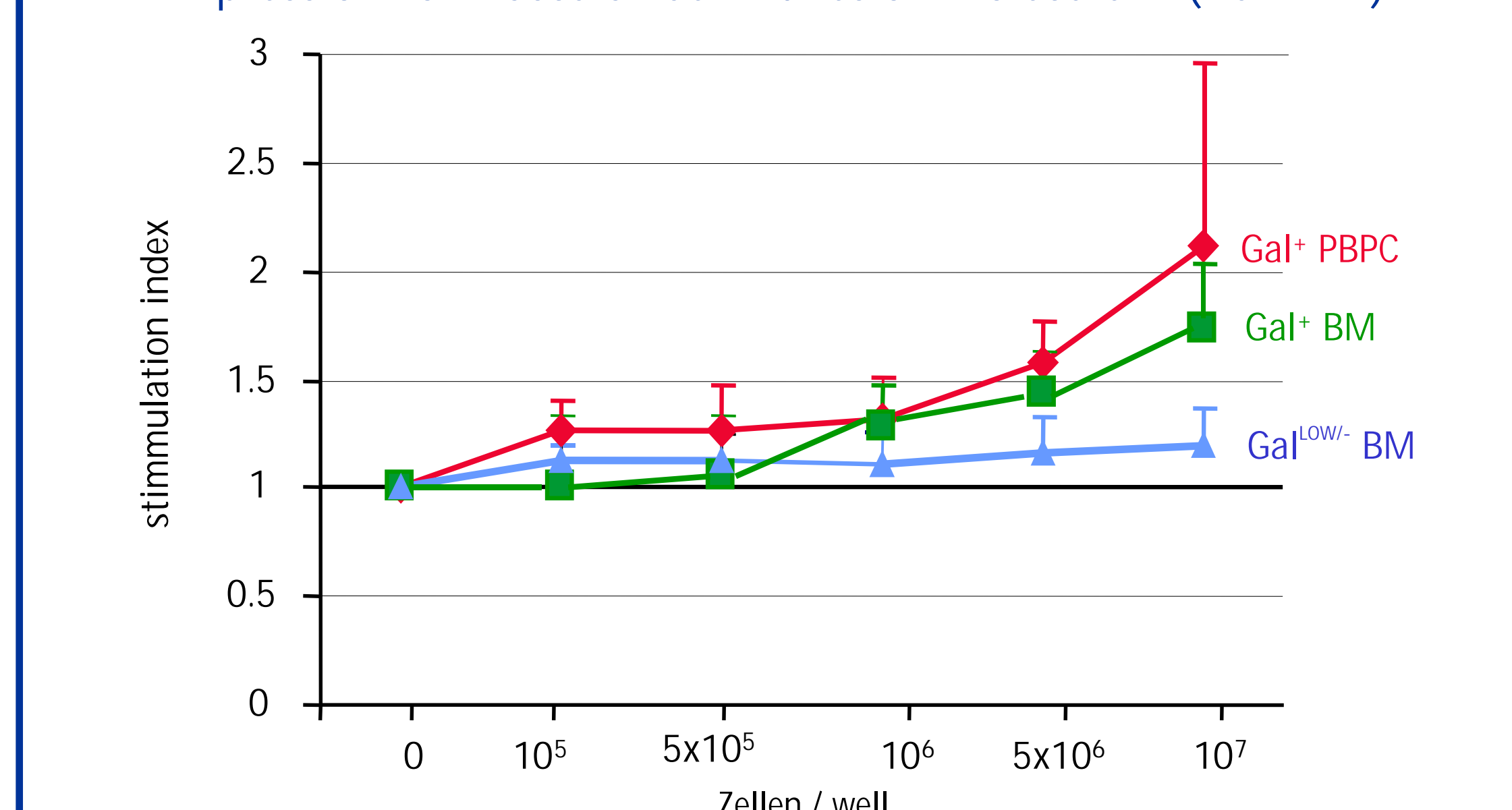


Abb. 7

Expression von Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)

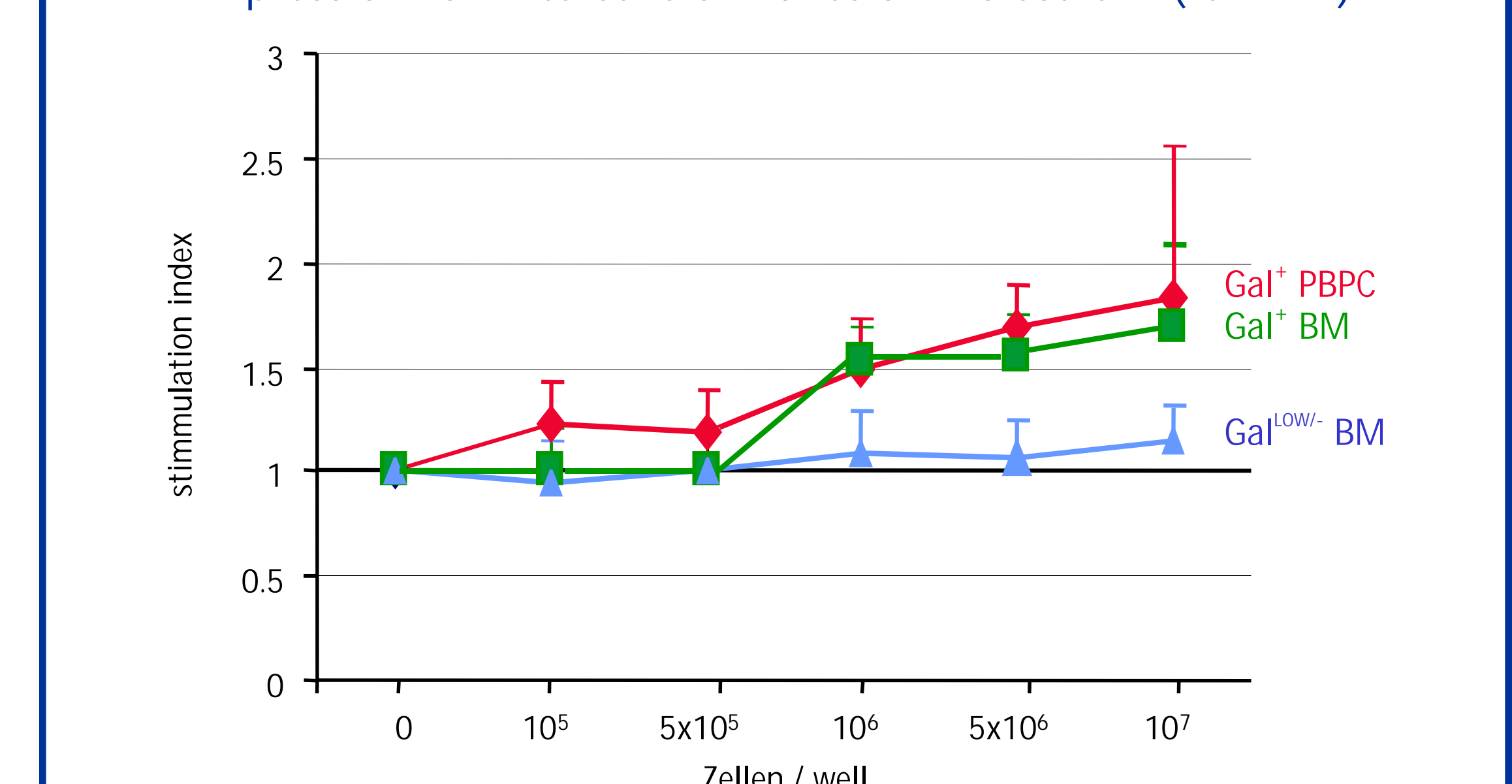


Abb. 8

Expression von E-Selectin

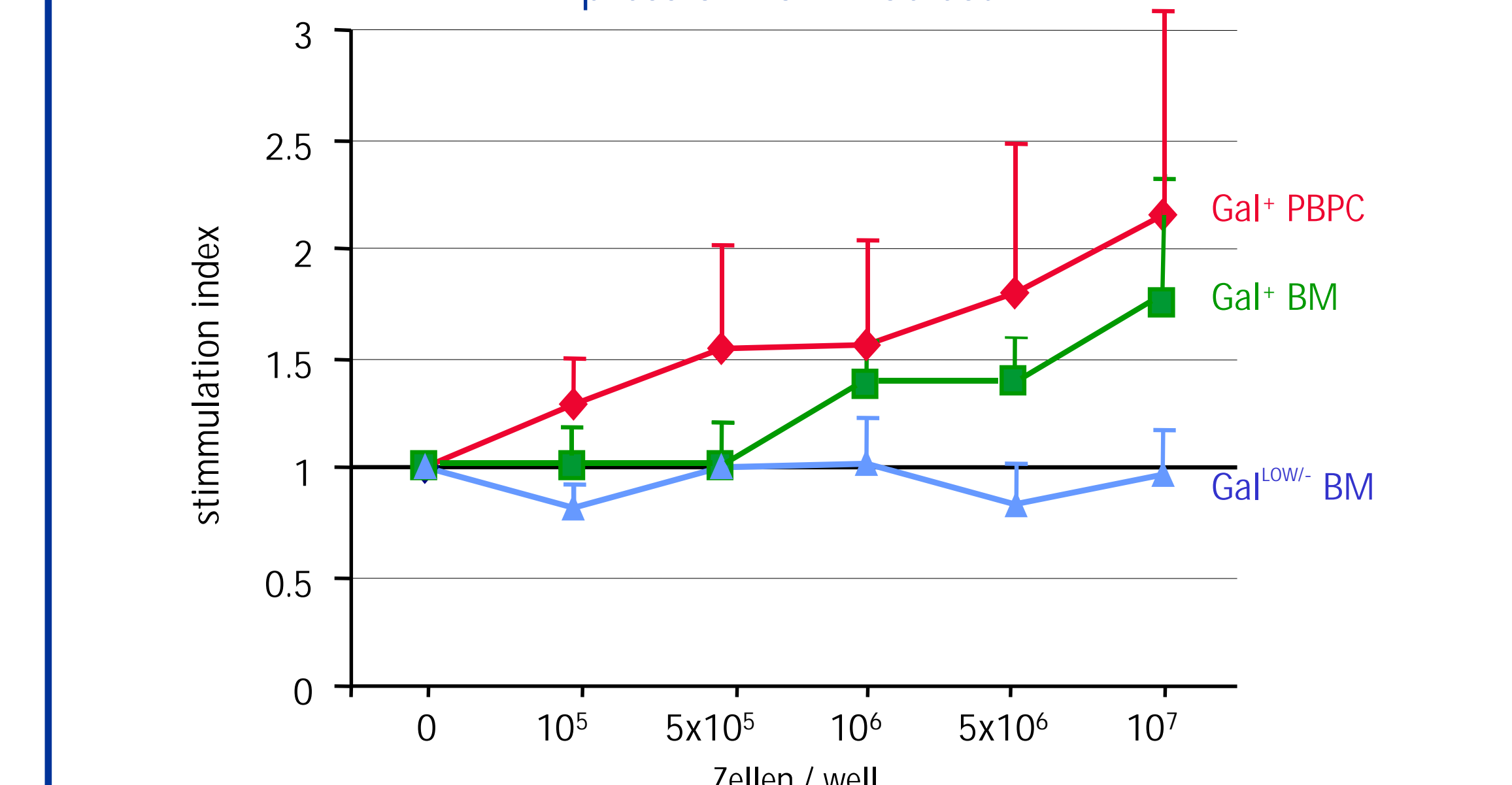


Abb. 9

- ◆ Im Gegensatz zu Gal⁺ PBPC oder KM-Zellen führen Gal^{low/-} KM-Zellen zu keiner Thrombozytenaggregation und zu keiner Endothelzellaktivierung von HUVEC.
- ◆ Die Induktion einer immunologischen Toleranz mittels hämatopoetischen Chimerismus wird durch die Verwendung von α -Galactosyltransferase-knockout-Schweinen erleichtert werden.