

## Inhaltverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Lebertransplantation – Historisches, heutiger Stand und Perspektiven</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Mechanismen der Rejektion</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>CTLA-4Ig</b>	<b>8</b>
<b>1.4</b>	<b>Adoptiver Zelltransfer (Spenderzellen) bei der Transplantation solider Organe</b>	<b>9</b>
<b>1.5</b>	<b>Apoptose in der Toleranzinduktion</b>	<b>10</b>
<b>1.6</b>	<b>Lebertransplantation unter tierexperimentellen Bedingungen</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>Fragestellungen dieser Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Tierwahl und Tierhaltung</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Vorbehandlung mit CTLA-4Ig und Milzzellen</b>	<b>16</b>
	<b>3.2.1 CTLA-4Ig</b>	<b>16</b>
	<b>3.2.2 Isolierung der Milzzellen</b>	<b>16</b>
<b>3.3</b>	<b>Experimenteller Plan</b>	<b>17</b>
<b>3.4</b>	<b>Technik der Lebertransplantation</b>	<b>18</b>
	<b>3.4.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung</b>	<b>18</b>
	<b>3.4.2 Instrumentarium und Nahtmaterial</b>	<b>18</b>
	<b>3.4.3 Besonderheiten der Leberanatomie bei Ratten und Operationsmethode</b>	<b>19</b>
	<b>3.4.3.1 Spenderoperation: Leberexplantation an der Ratte</b>	<b>19</b>
	<b>3.4.3.2 Empfängeroperation: Leberimplantation an der Ratte</b>	<b>20</b>
<b>3.5</b>	<b>Molekularbiologische, histologische und immunhistochemische Untersuchungen</b>	<b>21</b>
	<b>3.5.1 Probengewinnung</b>	<b>21</b>
	<b>3.5.2 Materialien, Puffer, Chemikalien für die Untersuchungen</b>	<b>22</b>
	<b>3.5.2.1 Materialien</b>	<b>22</b>
	<b>3.5.2.2 Puffer</b>	<b>22</b>
	<b>3.5.2.3 Chemikalien</b>	<b>23</b>
	<b>3.5.3 Molekularbiologische Untersuchungen</b>	<b>23</b>

3.5.3.1	Proteinaufreinigung und –bestimmung	23
3.5.3.2	Die Proteintrennung– SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
3.6	Histologische Technik	27
3.6.1	Hematoxilin-Eosin (H.E.)-Färbung	27
3.6.2	Immunhistochemische Untersuchungen (APAAP-Methode)	27
3.6.3	Detektion der In-situ-Apoptose	29
3.7	Statistik	30
4.	Ergebnisse	31
4.1	Klinischer Verlauf nach Lebertransplantation	31
4.2	Überlebenszeit	31
4.3	Histologische Veränderungen	32
4.4	Apoptose Nachweise	36
4.4.1	Apoptose Nachweise durch PARP-Western Blot	36
4.4.2	Apoptose Nachweise durch In-Situ-Apoptose Detektion	38
4.5	CD25-Expression (Interleukin-2-Rezeptor)	38
4.5.1.	CD25-Expression (Interleukin-2-Rezeptor) in der Leber	38
4.5.2.	CD25-Expression (Interleukin-2-Rezeptor) in der Milz	41
4.6	Chimärismus	43
5.	Spezifische Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung	45
6.	Diskussion	46
6.1	Toleranzinduktion - Mechanismen der Toleranzentwicklung	46
6.2	Zelluläre Mechanismen der Toleranzentstehung	46
6.3	Spezielle Aspekte der Leber bei der Entstehung von Toleranz	48
6.4	Effizienz der Blockade costimulatorischer Signale und der Vorbehandlung mit adoptivem Zelltransfer	49
6.4.1	CTLA-4Ig	49
6.4.2	Chimärismus	51
6.5	Charakterisierung der Effizienz einer Vorbehandlung mit CTLA-4Ig und spenderabgeleiteten Zellen anhand von Histologie, Überlebenszeit, CD25-Expression, Apoptose	

und Chimärismus	52
6.5.1 Überlebenszeit und Histologie	52
6.5.2 Interleukin-2	53
6.5.3 Apoptose	54
6.5.4 Chimärismus	56
7. Zusammenfassung	58
8. Abkürzungsverzeichnis	60
9. Literatur	61
10. Danksagung	69
11. Lebenslauf	70
12. Erklärung	71

## **1. Einleitung**

### **1.1 Lebertransplantation – Historisches, heutiger Stand und Perspektiven**

Die erste Lebertransplantation wurde 1963 von Thomas E. Starzl in Denver bei einem Kind mit Gallengangsatresie durchgeführt (62). Allerdings dauerte es bis 1967, bis die erste erfolgreiche Lebertransplantation, die der Patient über ein Jahr überlebte, gelang (46).

Danach konnte das Verfahren zwar chirurgisch-technisch immer mehr verfeinert werden, der eigentliche Durchbruch gelang aber erst Ende der siebziger Jahre mit Einführung von Cyclosporin A zur potenten Immunsuppression und damit erstmalig der Möglichkeit einer suffizienten Vermeidung einer Abstoßung (8).

In Deutschland wurde 1969 erstmals eine Lebertransplantation von Gütgemann in Bonn durchgeführt (25). In der ehemaligen DDR führte Wolff in Dresden 1977 die erste Lebertransplantation durch und entwickelte in den 80er Jahren ein Transplantationsprogramm an der Charite (25). Die weitere Entwicklung der Lebertransplantation in Deutschland wurde aber maßgeblich durch einen anderen Pionier, Rudolph Pichlmayr, geprägt, welcher ein erfolgreiches Transplantationsprogramm an der medizinischen Hochschule Hannover begründete (25).

Durch die Verbesserung der chirurgischen Technik und intensivmedizinischen Betreuung sowie der Entdeckung einer potenten Immunsuppression gehört die orthotope Lebertransplantation seit den 90er Jahren zu den Standardverfahren im therapeutischen Spektrum zahlreicher Erkrankungen bei Patienten mit akutem oder chronischen Leberversagen (25).

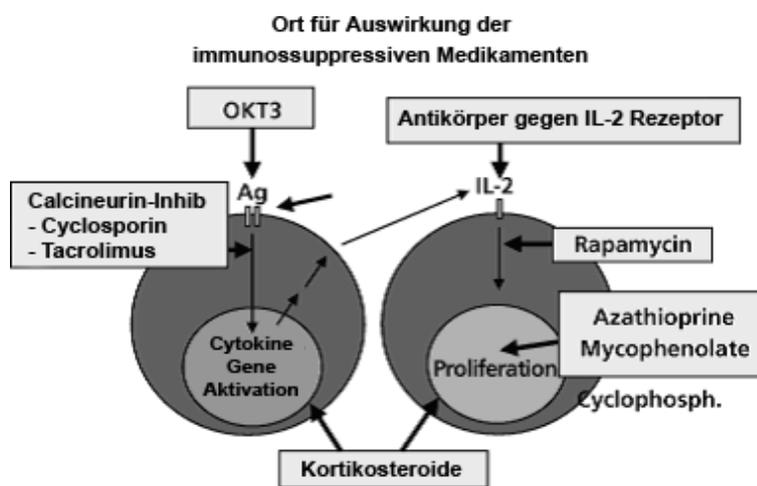
Die derzeitige Lebertransplantationsfrequenz liegt in Deutschland seit 1997 bei etwa 800 Transplantationen pro Jahr in insgesamt 25 Transplantationszentren (25).

Eine wesentliche Rolle für den klinischen Erfolg der Transplantation von soliden Organen spielt die Immunsuppression, die der Unterdrückung einer zwangsläufig stattfindenden Abstoßungsreaktion dient (15). Die Transplantationsmedizin kann man dahingehend in zwei zeitliche Phasen unterteilen, die vor und die nach Einführung von Cyclosporin A (49).

Kurz nach der klinischen Einführung durch Sandoz (heute Novartis), wendeten Calne et al. (8) im Jahr 1978 zum ersten Mal Cyclosporin in einer kleinen klinischen Serie von Lebertransplantationen an, und konnte bereits hier eindrucksvoll dessen immunsuppressive Potenz belegen. Cyclosporin wirkt als sog. „Calcineurin inhibitor“,

der durch Hemmung reifer T-Zellen und einer Störung der IL-2-abhängigen Antigenpräsentation eine Lymphozyten-Proliferation und letztendlich Abstoßungsreaktionen verhindert (18, 72).

Als weitere neuere Medikamente sind heute das ähnliche wirkende Prograf (Tacrolimus) sowie Mycophenolat Mofetil und Rapamycin bekannt (5, 38) Allerdings ist Cyclosporin nach wie vor weltweit das bei soliden Organtransplantationen am meisten verwendete Immunsuppressivum.



**Abbildung 1.** Übersicht über die Anwendung immunosuppressiver Pharmaka (modifiziert nach Bertolino (5))

Die oben erwähnten Medikamente können auch, vor allem im Langzeitverlauf, zu beträchtlichen unerwünschten Wirkungen, wie opportunistischen Infektionen, Tumoren, nodulären regenerativen Hyperplasien, Nephrotoxizität, Hypertonie oder metabolischen Störungen führen (18).

Zur Verringerung solcher Effekte versuchen deswegen Wissenschaftler seit Beginn der Transplantation, die Akzeptanz eines Transplantats ohne Anwendung einer dauerhaften Immunsuppression, also die Ausbildung von Toleranz gegenüber dem Fremdorgan zu induzieren (58).

Nach Waldmann et al. (77) gründen sich die Ansätze solcher Studien zur Toleranzinduktion meist auf die Modulation der drei innerhalb einer Abstoßungsreaktion ablaufenden Stadien, der sog. Signaltransduktion.

## 1.2 Mechanismen der Rejektion

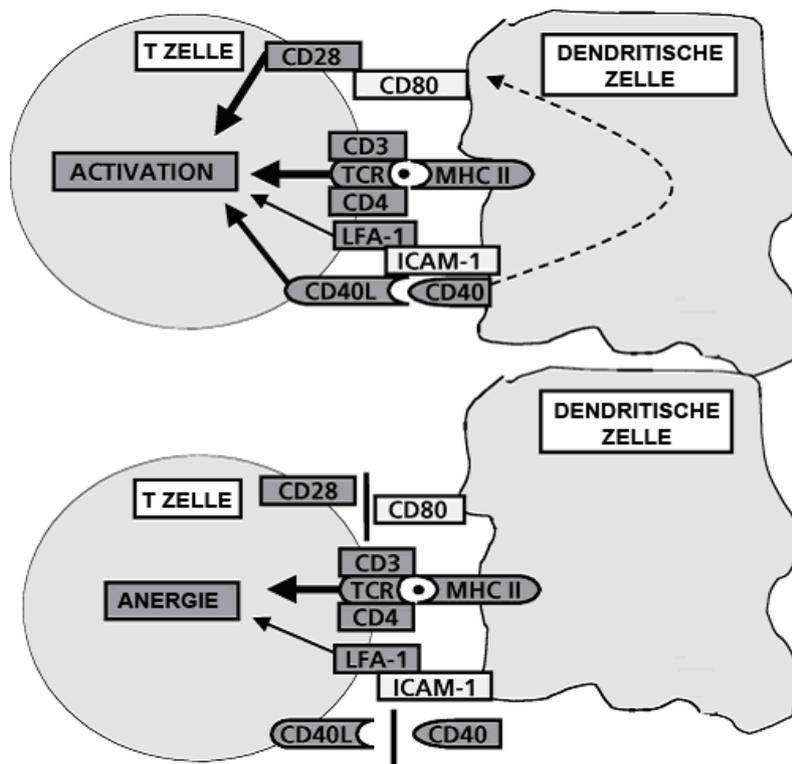
Eine Abstoßungsreaktion ist Folge der Unverträglichkeit des Organismus gegen das Transplantat. Sie stellt die spezifische Antwort des Immunsystems dar, welches die biologische Individualität und Integrität des Organismus erhalten soll (1).

Bei fast allen soliden Organtransplantationen korreliert der Grad einer Abstoßungsreaktion mit der „Verschiedenheit“ des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der T-Zellen zwischen Spender und Empfänger (83).

Die Gene des MHC im menschlichen Organismus liegen auf Chromosom 6 und sind in zwei Klassen getrennt: zur MHC-Klasse I gehören HLA- A, B, C und zur MHC-Klasse II HLA- DR, DP, DQ. Im Verlauf einer Abstoßungsreaktion kann man drei wichtige Signale zwischen Zellen des Spenders und Empfänger unterscheiden, die man unter dem Begriff der Signaltransduktion zusammenfassen kann.

Das erste Signal ist antigenspezifisch (77), und an diesem ersten Schritt sind Antigen-präsentierende Zellen (APC), also Monozyten, Makrophagen und B- sowie T-Zellen beteiligt. APC machen insgesamt ca. 2% der Zellen des Lymphgewebes aus und sind in der Lage über eine Vielzahl von auf der Zelloberfläche lokalisierten Molekülen mit T-Zellen zu interagieren (77). In der Leber werden diese Antigen-präsentierenden Funktionen teilweise durch parenchymale und nichtparenchymale Zellen übernommen (18). Diese besonderen Leberzellen exprimieren auch sog. kostimulatorischen Moleküle, diese können in das Gewebe migrieren und sind zu einer direkten Antigenpräsentation fähig. Sie werden als „Dendritic Cells“ (DC) bezeichnet (42).

Das zweite Signal ist antigenunspezifisch und schließt die Oberflächenantigene B7.1, B7.2, CD40L, CD28, ICAM-1, VCAM-1 ein, die sowohl von den Spenderleberzellen - als auch DCs des Empfängers exprimiert werden (42). B7.1/B7.2 Rezeptoren interagieren mit dem CD28 Rezeptor der T-Zellen (24).



**Abbildung 2.** Rezeptorexpression und Signaltransduktion zwischen T-Zelle und dendritischer Zelle (18)

Ein drittes Signal wird durch T-Zellen (CD4+ und CD8+), Zytokinproduktion und Zytokinfreisetzung bedingt (82). Das bedeutet, dass die aktivierten T-Zellen des Empfängers Zytokine freisetzen können, die direkt eine Abstoßung generieren.

Von allen T-Zell-Populationen, die im Verlauf einer Abstoßungsreaktion beteiligt sind spielen für die Entwicklung der Abstoßung und Toleranzinduktion insbesondere die Th1- und Th2-Zellen, eine wichtige Rolle (18).

Das Zytokin-Profil der Th1-Zellen schließt Interleukine der zellvermittelten Immunantwort wie IL-2, IL-12 und  $\gamma$ -IFN ein. Traditionell werden Th1-Zellen über IL-2 identifiziert, welches u.a. ein Faktor für Wachstum, Differenzierung und Proliferation der T-Zellen ist (17).

Veränderungen der IL-2-Werte nach Lebertransplantation zeigen, dass IL-2 eine Rolle für Organakzeptanz und Abstoßung spielt und als prognostischer Parameter für letztere dienen kann (86). Aus diesem Grund wurde in vielen experimentellen Studien die IL-2 Expression nach ORLT untersucht (86, 50).

Durch eine einzelne oder kombinierte Anwendung spezifischer, gegen die oben erwähnten T-Zell-Rezeptoren oder T-Zell-Interleukine gerichtete Antikörper, kann jeder der drei Schritte der Signaltransduktion blockiert werden (77).

Zur Gruppe solcher Antikörper gehört CTLA-4Ig, welches den zweiten Schritt in der Signaltransduktion unterbricht. Die Rolle dieses Antikörpers hinsichtlich einer möglichen Toleranzinduktion wurde in dieser Studie in einem tierexperimentellen Transplantationsmodell untersucht.

### 1.3 CTLA-4Ig

CTLA-4Ig ist ein rekombinantes Fusionsprotein, das aus einem Derivat des extramembranösen Teils des CTLA-4 (**C**ytotoxic **T**-Lymphocyte **A**ntigen **4**) und einem Fc-Teil eines IgG1 Antikörpers besteht (43).

Es wirkt während der Abstoßung inhibierend auf den zweiten Schritt der Signaltransduktion und zwar konkret auf die Rezeptorbindung CD28:B7 zwischen APC- und T-Zellen, also der sogenannten Costimulation (42).

Der CD28-Rezeptor in der Rezeptorbindung CD28:B7 ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 44kDa und besteht aus drei Teilen mit extramembranöser, transmembranöser und intrazellulärer Lokalisation. Sein Gen liegt auf Chromosom 2.

Der CTLA-Rezeptor ist ein Membranadhäsionsmolekül, welches homolog zu CD28 ist und dessen Gen sich ebenfalls auf Chromosom 2 befindet. CD28 und CTLA-4 sind zwei Liganden für den Rezeptor B7 (B7.1 und B7.2.). Die B7-Rezeptor-Familie der APC kann durch die Bindung an CD28 der T-Zellen letztere aktivieren.

Weil die Affinität zwischen CTLA4 und der B7-Familie zwanzigmal größer als die zwischen CD28 und der B7-Familie ist (43), kann man diesen Schritt der Signaltransduktion durch CTLA-4Ig manipulieren.

Ein weiterer Membranrezeptor ist CD40, welcher von B-Zellen, DC und Makrophagen exprimiert wird. Der CD40-Rezeptor wird kurz nach der T-Zellrezeptor-Bindung auf Antigen-präsentierenden Zellen oberflächlich exprimiert und potenziert funktionell die B7 und ICAM-1-Expression sowie CD28:B7-Bindung (42,43). Für den Verlauf der Costimulation kann deswegen ein direkter und ein indirekter Weg, abhängig von der CD40-Expression, beschrieben werden (89), s. Abb.2 von Goddard et al (18).

Die einzelne oder kombinierte Anwendung spezifischer, gegen diese Rezeptoren oder CTLA4, gerichteten Antikörper als Blocker der Costimulation wurde in den letzten Jahren umfangreich erforscht (54, 67, 80).

Folgende Eigenschaften von CTLA-4 Ig sind bisher bekannt:

- CTLA-4Ig supprimiert die APC- und T-Zell-Interaktion (20)
- CTLA-4Ig beeinflusst die Markerexpression aktivierter T-Zellen (20, 55)

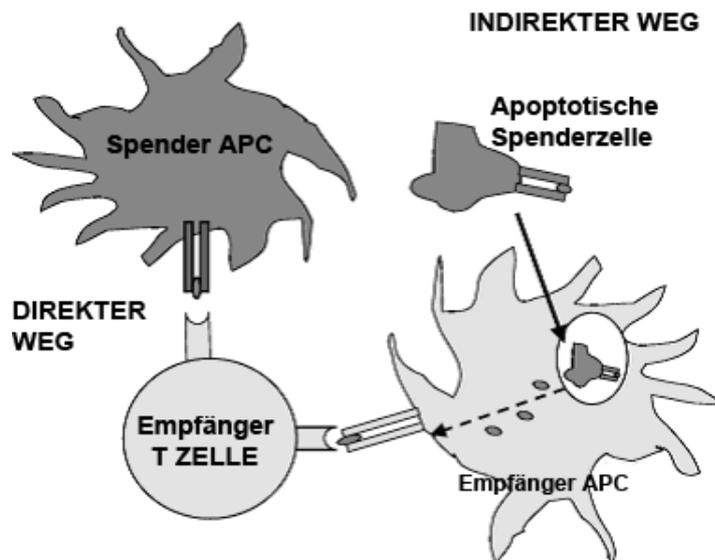
- CTLA-4Ig führt zur Reduktion der Th1- und Erhöhung der Th2-Produktion (3, 4).
- CTLA-4Ig vermittelt eine alloreaktive T-Zellapoptose (20, 55)

CTLA4-Ig wurde mit anti-CD4(+)mAb als Ko-Therapie in einem Versuch in Ratten verwendet. Dabei wurde eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit erreicht (87). In einem anderen Versuch führte die Unterbrechung der CD28:B7-Interaktion durch CTLA-4Ig zur Zellhypoaktivität, Anergie und Apoptose in murinen und humanen T-Zellen (55).

#### **1.4 Adoptiver Zelltransfer (Spenderzellen) bei der Transplantation solider Organe**

Da es sich gezeigt hat, dass es schwierig ist, einen langfristig dauernden Zustand der Nichtreaktivität des Immunsystems gegenüber der Gesamtheit der spezifischen Antigene durch die alleinige CTLA-4Ig-Anwendung zu erreichen, wurde die einzelne oder kombinierte Anwendung von Spenderzellen, der so genannte adoptive Zelltransfer als weitere Möglichkeit zur Entwicklung von Toleranz untersucht (52, 70, 71).

Da die Leber eine besondere Rolle für die Transplantattoleranz hat, wurde sie als ein „immunologisch begünstigtes Organ“ bezeichnet (49). Als Grund hierfür wurden unspezifische immunsuppressive Effekte, lebereigene Faktoren, wie eine spezifische Reduktion der zellulären Immunreaktion und ein verminderter Antigengehalt der Leberparenchymzellen diskutiert (57). Im Prinzip ist die Reduktion der Empfängerimmunität von den mit dem Transplantat übertragenen löslichen immunologischen Faktoren, Antikörpern und MHC-Molekülen abhängig (59). Andererseits kann eine Hyporeaktivität des Empfängers durch die mittransplantierten Zellen bedingt sein. Es gibt die Hypothese, dass dieser Zelltransfer während der Transplantation die T-Zell-Immunantwort des Empfängers unterdrückt (6). Wahrscheinlich haben die mitübertragenen Spenderzellen APC-Eigenschaften (46), reagieren daher mit T-Zellen des Empfängers und rufen schließlich eine Erschöpfung alloreaktiver T-Zellen hervor und induzieren so eine gewisse Toleranz (6).



**Abbildung 3.** Direkter und indirekter Mechanismus der Antigenpräsentation (modifiziert nach Goddard (18))

Der Nachweis von Spenderzellen im Empfänger zu mehr als 15% für mindestens 34 Wochen wurde als Chimärismus bezeichnet (69, 70, 71). Zum ersten Mal wurde diese von Opelz und Terasaki untersucht.

In einer anderen Studie konnten Kriesel et al. (36) zumindest teilweise Toleranz durch Splenozyteninfusion als Vorbehandlung bei Lebertransplantation an Ratten erzielen. Nach Transplantation zeigte sich bei den mit Splenozyteninfusion behandelten Empfängern eine weniger ausgeprägte Immunantwort im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein Problem einer solchen Behandlung ist allerdings die Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Zellinfusion in Bezug zur Transplantation. Die Injektion von Spenderzellen oder -gewebe eine Woche vor der Transplantation oder danach kann im Tiermodell die Transplantatüberlebenszeit bei Leber, Niere und Haut bei Ratten verlängern: dieser Effekt wurde z.B. in der bestimmten Stammkombination im Model der Lebertransplantation von Dresske (14) untersucht.

### 1.5 Apoptose in der Toleranzinduktion

Als Apoptose bezeichnet man einen so genannten programmierten Zelltod, und man weiß heute, dass dieses noch nicht so lang bekannte Phänomen, die häufigste Form des Zelltodes im Organismus darstellt (33, 34). Kerr und Wyllie (33) beschreiben Apoptose wie folgt: „Der Prozess beinhaltet eine Blähung der Membran, Schrumpfung und Desintegration des Zytoplasmas und des Nukleus sowie die

Desintegration der Zellen zu Apoptosekörperchen, die von einer intakten Zellmembran umschlossen sind. Die Apoptose wird genetisch reguliert und dient dazu, die Nekrose zu begrenzen und insbesondere alte geschädigte oder redundante Zellen zu eliminieren.“

Die biochemischen Veränderungen einer Apoptose schließen im Gegensatz zur Nekrose eine Erhöhung katabolischer Mediatoren und zytolytischer Enzyme ein (Tabelle 1).

<b>Lokalisation</b>	<b>Nekrose</b>	<b>Apoptose</b>
	<i>Einheitlicher degenerativer Prozess, Zellverbund betroffen</i>	<i>Aktiver energiefordernder Prozess, de novo Genexpression nötig, einzelne Zellen</i>
<i>Mitochondrien</i>	<i>ATP-Depletion</i>	<i>Funktionell intakt</i>
<i>Plasmamembran</i>	<i>Membranintegrität verloren, Ionengradient gestört</i>	<i>Weitgehend intakt, apoptotische Körper</i>
<i>Kern</i>	<i>Primär unverändert</i>	<i>Schalenförmig kondensiert</i>
<i>DNA-Fragmente</i>	<i>Chromatin degeneriert</i>	<i>DNA-Fragmente, nukleosomale Fragmente</i>
<i>Zellvolumen</i>	<i>Erhöht, Zellschwellung</i>	<i>Schrumpfung, Verlust der „gap junction“</i>
<i>intrazellulär</i>	<i>Lysosomale Enzyme, Entzündung, erhöhte Serum-Transaminasen</i>	<i>Keine Enzymfreisetzung, gesunde Nachbarzellen, keine Entzündung</i>

**Tabelle 1.** Gegenüberstellung von Nekrose und Apoptose (33, 34)

Die wichtigsten Moleküle im Ablauf einer Apoptose sind Fas und Fas-Ligand (FasL). Fas-Proteine gehören zur „Todesrezeptorfamilie“ und zeigen eine Expression in verschiedenen Geweben. Eine andere Proteingruppe, die an der Apoptose beteiligt ist, ist die Familie der Caspasen. Diese liegen zunächst als sog. Pro-Caspase-Form vor und werden erst im Verlauf einer Reaktionskaskade aktiviert.

Caspasen zeigen unterschiedliche Lokalisationen in den Zellen. Caspase-1 ist im Zytoplasma und teilweise im Nukleus lokalisiert. Caspase-9 zeigt sich im Verhältnis 1:1 im Zytoplasma- und Nukleus. Caspase-8 und -10, die auch als Initiatorcaspasen bekannt sind, werden normalerweise im Zytoplasma nachgewiesen.

<b>Caspasen</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Apoptose-Induktion</b>
<i>Caspase-1</i>	<i>Zytoplasma&gt;Kern</i>	(+)
<i>Caspase-3</i>	<i>Zytoplasma&gt;Kern</i>	(-)
<i>Caspase-6</i>	<i>Zytoplasma&gt;Kern</i>	(-)
<i>Caspase-7</i>	<i>Zytoplasma&gt;Kern</i>	(-)
<i>Caspase-9</i>	<i>Zytoplasma&gt;Kern</i>	(-)
<i>Caspase-2</i>	<i>Kern</i>	(++)
<i>Caspase-8</i>	<i>Zytoplasma</i>	(++)
<i>Caspase-10</i>	<i>Zytoplasma</i>	(++)

**Tabelle 2.** Übersicht verschiedener Caspasen (modifiziert nach 33, 34)

Wekerle (80) unterscheidet zwei Mechanismen der Apoptose: Die FasL-Apoptose alloreaktiver T-Zellen und eine FasL-unabhängige Apoptose naiver T-Zellen. Letztere kann durch das CD28-Signal, Wachstumsfaktor-Sekretion und bcl-xL-Produktion unterbrochen werden. Yomada und Sayegh (89) unterscheiden bei der T-Zell-Apoptose eine aktive (ACID) von der passiven Apoptose (PACD).

Grob zusammengefasst verläuft die aktive Apoptose von T-Zellen folgendermaßen: Nach der Antigenpräsentation und IL-2-Stimulation wird CD95 auf CD8(+)-T-Zellen exprimiert. Danach folgt die Signaltransduktion mit einer Aktivierung der Procaspase-8. Es folgt eine chemische Kettenreaktion, die zum (apoptotischen) Tod der T-Zellen führt, die eigentlich für die Abstoßung des Transplantats im Empfänger zuständig ist. Der Mechanismus der passiven Apoptose ist nicht genau geklärt.

### **1.6 Lebertransplantation unter tierexperimentellen Bedingungen**

Seit Entwicklung der Mikrochirurgie sind Versuche an Ratten und Mäusen bevorzugte Modelle für die Erforschung von immunologischen Prozessen im Transplantat (32).

Im Jahr 1973 wurde von Lee et al. die erste erfolgreiche mikrochirurgische Lebertransplantation an Ratten durchgeführt. Die Schwierigkeiten lagen insbesondere in der technischen Durchführung der Lebertransplantation, Organkonservierung und -perfusion und den begleitenden Komplikationen des postoperativen Verlaufs (39). Später etablierte Lee die Grundlagen dieses als experimentelles Konzept zur Erforschung der Lebertransplantation bzw.

Signaltransduktion und zur Bewertung der Effizienz unterschiedlicher Behandlungsmethoden wie Antikörpern oder Knochenmark (32, 39).

Für die Beobachtung von Transplantatüberlebenszeit, Toleranz und anderer Schwerpunkte der Abstoßungsreaktion, untersuchten Zimmermann und Davies (83) die Stammkombinationen verschiedener Rattenspezies und fanden unterschiedliche Überlebenszeiten abhängig von der genetischen Verschiedenheit zwischen Spender und Empfänger. Die entsprechenden MHC-Gene dafür befinden sich auf Chromosom 14 und sind in zwei Klassen: Klasse I Loci schließen RT1.A, Pa, F, E, G, C ein und Klasse II Loci schließen RT1.B, RT1.D, RT1.H ein, unterteilt.

Die Stammkombinationen von Ratten wurden entsprechend der Intensität einer Abstoßung als „high-responder“, „middle-responder“ und „low-responder“ eingeteilt. Bei „high-respondern“ beträgt die Überlebenszeit zwischen 10 und 18 Tagen, bei „middle-respondern“ zwischen 11 und 63 Tagen und bei „low-respondern“ über 100 Tage (so genannte Langzeittiere).

Reaktivität	Spender-Stamm	Empfänger-Stamm	Ratten(n)	Mittleres Überleben(Tage)
High Responder	AUG(RT1 <sup>c</sup> )	LEW(RT1 <sup>l</sup> )	5	18.2
	PVG(RT1 <sup>c</sup> )	LEW(RT1 <sup>l</sup> )	5	16
	DA(RT1 <sup>a</sup> )	LEW(RT1 <sup>l</sup> )	5	11.2
	DA(RT1 <sup>a</sup> )	BN(RT1 <sup>n</sup> )	6	10.8
Middle Responder	LEW(RT1 <sup>l</sup> )	AUG(RT1 <sup>c</sup> )	5	15.6
	DA(RT1 <sup>a</sup> )	AUG(RT1 <sup>c</sup> )	5	11.2
	LEW(RT1 <sup>l</sup> )	PVG(RT1 <sup>c</sup> )	5	32.6
	LEW(RT1 <sup>l</sup> )	BN(RT1 <sup>n</sup> )	5	48.4
	AUG(RT1 <sup>c</sup> )	BN(RT1 <sup>n</sup> )	5	45
	PVG(RT1 <sup>c</sup> )	BN(RT1 <sup>n</sup> )	5	36.2
	BN(RT1 <sup>n</sup> )	AUG(RT1 <sup>c</sup> )	5	63
Low Responder	DA(RT1 <sup>a</sup> )	PVG(RT1 <sup>c</sup> )	5	>100
	BN(RT1 <sup>n</sup> )	PVG(RT1 <sup>c</sup> )	5	>100
	PVG(RT1 <sup>c</sup> )	DA(RT1 <sup>a</sup> )	5	>100
	LEW(RT1 <sup>l</sup> )	DA(RT1 <sup>a</sup> )	5	>100
	BN(RT1 <sup>n</sup> )	DA(RT1 <sup>a</sup> )	5	>100
	AUG(RT1 <sup>c</sup> )	DA(RT1 <sup>a</sup> )	5	>100
	BN(RT1 <sup>n</sup> )	LEW(RT1 <sup>l</sup> )	4	>100

**Tabelle 3.** Überleben von allogenen lebertransplantierten Ratten in Abhängigkeit von der Abstoßungsstärke in den verschiedenen Stammkombinationen (RT1 und nicht-RT1 inkompatibel) (nach Zimmermann und Davies (83))

## **2. Fragestellungen dieser Arbeit**

*1. Wie beeinflusst die Vorbehandlung mit einem adoptiven Zelltransfer die akute Abstoßung des Transplantats im Modell der Rattenlebertransplantation?*

*2. Wie beeinflusst die Vorbehandlung mit CTLA-4Ig die akute Abstoßung des Transplantats?*

*3. Ist die kombinierte Therapie mit CTLA-4Ig und spendergenerierten Zellen sinnvoll?*

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Tierwahl und Tierhaltung**

Wie unter 1.6 beschrieben, wurden für das akute Abstoßungsmodell die Stämme LEW (Lewis, MHC: RT1<sup>1</sup>) und DA (Dark Agouti, MHC:RT1<sup>a</sup>) verwendet. Hierbei dienten die Dark Agouti-Tiere (DA, RT1<sup>a</sup>) als Spender und Lewis-Tiere (LEW (RT1<sup>1</sup>)) als Empfänger.

Zur Verwendung kamen männliche Tiere mit einem Gewicht von 250–300 g und einem Alter von 8–10 Wochen, welche von der Firma Harlan und Winkelmann bezogen wurden. Die Aufenthaltszeit der Versuchstiere betrug eine Woche vor dem Experiment nach Anforderung des Tierschutzes. Die Dauer der postoperativen Zeit lag zwischen 6 und 150 Tagen.

Alle Experimente wurden in der tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums des Virchow-Klinikums Berlin durchgeführt.

#### **3.2. Vorbehandlung mit CTLA-4Ig und Milzzellen**

Die Vorbehandlung der Tiere bestand entweder aus CTLA-4Ig oder isolierten Spendermilzzellen (jeweils alleine und in Kombination), deren Applikation in Kurznarkose mit Isofluran + Sauerstoff + Lachgas durchgeführt wurde.

##### **3.2.1 CTLA-4Ig**

CTLA-4Ig wurde in einer Dosierung von 0,5 mg/pro Tier durch intraperitoneale Injektion (i.p.) appliziert.

Zur Verfügung gestellt wurde das Studien-CTLA-4Ig durch Dr. Peter Linsley von Bristol Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute in Seattle, Washington.

##### **3.2.2 Isolierung der Milzzellen**

Die Milzzellenseparation wurde nach Protokoll des Forschungslabors unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Milz der Spender (DA-)Ratte wurde nach Entnahme in eine Petrischale gegeben und mit ausreichend Medium übergossen. Das Medium wurde aus 500ml RPMI 1640, 5ml L-Glutamin, 5ml Pen-Strep, 5ml Natrium Pyruvate, 5ml Non-Essential Amino Acids (MEM) und 1ml 2M Mercaptoethanol angesetzt.

<b>Medium</b>	<b>Substanzen</b>
	500ml RPMI 1640 5ml L-Glutamin 5ml Pen-Strep 5ml Sodium Pyruvate 5ml Non-Essential Amino Acids (MEM) 1ml 2M Mercaptoethanol

**Tabelle 4.** Zusammensetzung des Mediums zur Zellisolierung

Das Organ wurde mit Skalpell und Pinzette zerkleinert, das Fettgewebe entfernt. Mit einem sterilen Glasschliffstopfen wurden die Organstücke zerdrückt.

Nachfolgend wurden die Zellen mit einer Pipette aufgenommen und durch ein Nylonnetz in ein weiteres Falconröhrchen gegeben. Die Petrischale wurde mit Medium nachgespült, so dass alle noch am Boden haftenden Zellen aufgenommen wurden.

Die Falconröhrchen wurden bei 1.300U/min. 8 Min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 15ml TrisNH<sub>4</sub>HCL resuspendiert und für 8–10 Min. stehen gelassen, um die Lyse der Erythrozyten herbeizuführen.

Nach der Inkubation wurde TrisNH<sub>4</sub>HCL 1:2 mit Medium verdünnt und erneut bei 1.000 U/min. für 5 Min. zentrifugiert. Danach wurde es drei Mal mit ca. 15ml Medium gewaschen und bei 1.000U/min. für 5 Min. erneut zentrifugiert.

Die Zellen wurden in 1ml resuspendiert und gezählt. Für die Zellzählung wurden sie mit Trypanblau angefärbt. Die Zellen wurden anschließend mit Medium so alliquotiert, dass sie in der Dosis  $2,5 \times 10^8$  Milzzellen/pro Tier über die Penisvene verabreicht werden konnten.

### **3.3 Experimenteller Plan**

Der experimentelle Plan gliederte sich in drei Gruppen vorbehandelter Tiere. Zum Vergleich wurde eine Kontrollgruppe mit unbehandelten Tieren transplantiert. Jede Gruppe bestand aus 13 Tieren der Stammkombinationen DA auf LEW.

Die Tiere wurden an definierten Tagen (-8, -7, -3, -2) vor der Transplantation mit der einzelnen und/oder kombinierten Vorbehandlung mit CTLA-4Ig und/oder Milzzellen in folgenden Dosierungen behandelt:  $2,5 \times 10^8$  Milzzellen/ pro Tier durch die Penisvene (i.v.) und 0.5mg CTLA-4Ig/pro Tier (i.p.) appliziert.

Die Transplantation wurde unter Anästhesie mit Isofluran+Lachgas+Sauerstoff nach dem Transplantationsverfahren von Lee (39) mit Modifikation von Zimmermann (83) durchgeführt.

Drei Tiere pro Gruppe wurden jeweils am Tag 6 und 12 nach Transplantation zur weiteren pathologischen und immunologischen Untersuchung hinsichtlich einer möglichen Abstoßungsreaktion getötet. Die restlichen Tiere pro Gruppe waren langzeitüberlebende Tiere (LZT). In der Kontrollgruppe gab es keine LZT.

Die Tiere der Gruppe 1 waren unbehandelte Kontrollen und wurden nur transplantiert. In der Gruppe 2 erhielten alle Tiere am Tag -7 und -2 vor der Transplantation DA-Spenderzellen in einer Dosis von  $2,5 \times 10^8$  Milzzellen/pro Tier über die Penisvene (i.v.). In Gruppe 3 erhielten alle Tiere am Tag -8, -7, -3, -2 vor der Transplantation CTLA-4Ig in der Dosis 0,5 mg/pro Tier intraperitoneal (i.p).

Gruppe 4 erhielt schließlich sowohl CTLA4-Ig an den Tagen -8, -7, -3, -2 und zusätzlich DA-Spenderzellen an den Tagen -7 und -2.

	<b>Behandlung Tag -8</b>	<b>Tag -7</b>	<b>Tag -3</b>	<b>Tag -2</b>	<b>Anzahl n</b>
<b>Gruppen</b>					
<b>1 (Kontrollen)</b>	keine	keine	keine	keine	13
<b>2</b>		DA-Zellen		DA-Zellen	13
<b>3</b>	CTLA4-Ig	CTLA4-Ig	CTLA4-Ig	CTLA4-Ig	13
<b>4</b>	CTLA4-Ig	DA-Zellen+ CTLA-4Ig	CTLA4-Ig	DA-Zellen+ CTLA-4Ig	13

**Tabelle 5.** Behandlungsschema der Versuchsgruppen

### 3.4 Technik der Lebertransplantation

#### 3.4.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Durch Maskenanästhesie wurden Isofluran, Lachgas und Sauerstoff in einer Konzentration zwischen 0,4–3,0%, abhängig von der gewünschten Tiefe der Anästhesie, verabreicht. Die Atem-/ Herzfrequenz sowie die fehlenden Reflexe wurden als Kennzeichen für die Narkosentiefe herangezogen. Die Tiere wurden in Narkose rasiert und desinfiziert.

#### 3.4.2 Instrumentarium und Nahtmaterial

Die Spender- und Empfängeroperationen wurden mittels Stereo-Operationsmikroskop (Fa. Leica) durchgeführt. Das Operationsinstrumentarium bestand aus chirurgischen Pinzetten, Mikropinzetten, Präparierscheren,

mikrochirurgischer Schere, kleinen Haken, Gefäßklemmen, Satinski-Klemmen, Mikroclips und Nadelhalter.

Das verwendete Nahtmaterial war Prolene 7/0 für die Anastomose der Vena cava sup., 8/0 Prolene für die Anastomosen von Vena cava inf., Pfortader und Ductus choledochus. Für Ligaturen wurde Seide 6/0 und für die Hautnaht 3/0 Dexon verwendet.

### **3.4.3 Besonderheiten der Leberanatomie bei Ratten und Operationsmethode**

Die Leber liegt bei Ratten im rechten und linken Oberbauch. Das Lebergewicht macht 3–5% der Gesamtkörpermasse aus. Anhand der Blutversorgung wird die Leber in Lobus lateralis, Lobus caudalis dexter, Lobus caudatus, Lobus caudatus sinister, Lobus centralis, Lobus quadratus und Lobus sinister unterteilt.

Die wichtigsten Lebergefäße sind V.cava sup., V. cava inf., Pfortader und die A. hepatica. Die Ratten haben einen Ductus choledochus ohne Gallenblase, der hinter dem Pylorus im Duodenum mündet.

Die Operation wurde nach der Originaltechnik nach Lee (39) mit einer Modifikation der Gallenganganastomose und Arterienpräparation nach Zimmermann (83) durchgeführt. Alle Anastomosen waren bei diesem Modell termino-terminale Anastomosen.

#### **3.4.3.1 Spenderoperation: Leberexplantation an der Ratte**

Das Abdomen wurde durch eine mediane Laparotomie vom Processus Xiphoideus bis zur Blase geöffnet. Danach wurde die Leber mit Ligatur der supra- und infrahepatischen Gefäße und V. suprarenalis mit dem Zugang unter der V. renalis mobilisiert. Die einzelnen Leberlappen wurden mit feinen Pinzetten frei präpariert und die Ligamente zwischen Leber und Hinterbauchwand durchtrennt. Die Präparation des Leberhilus begann mit der Darstellung der präpylorischen Vene, ihrer Ligatur und Durchtrennung. Die Pfortader wurde in Höhe der Einmündung der Letzteren unterfahren und leberwärts mobilisiert. Die A. hepatica communis wurde identifiziert und von der A. gastroduodenalis getrennt. Danach folgte die Ligatur und Durchtrennung der Aa. Gastrica sinistra und lienalis vom Truncus coeliacus und seine Freipräparation bis zum aortalen Ursprung.

Der D. choledochus wurde am Pankreasoberrand ligiert und angespannt, so dass nach Dilatation des Ganges durch den kontinuierlichen Gallefluss ca. 1cm distal der

Gallengangsgabel eine die halbe Zirkumferenz des Ganges umfassende Inzision angelegt werden konnte. In dieser Öffnung wurde ein Polyäthylensplint (24G) eingeführt und mit einem Faden fixiert.

Nach der Heparininfusion per Penisvene wurde die Leber über die Pfortader mit dem speziell vorbereiteten Perfusionssystem perfundiert. Die Vorderwand der geklemmten Pfortader wurde mit der mikrochirurgischen Schere inzidiert und kanüliert. Die Leber wurde mit 4 °C kalter 0,9%-NaCl-Lösung perfundiert. Die Infusionsgeschwindigkeit des Perfusionssystems betrug ca. 40 Tropfen/min. Anschließend erfolgte die Eröffnung der suprahepatischen Vena cava durch das Zwerchfell. Das Zeichen einer gleichmäßigen Perfusion war die homogen entfärbte Leber.

Danach wurde die Aorta abdominalis mit einem Patch abgeschnitten und mit 1ml NaCl-Lösung durchgespült. An der Hinterwand der suprahepatischen Vena cava wurden Prolene-7/0-Fäden geknotet.

Am Ende erfolgte das Entfernen der perfundierenden Kanüle und Leberentnahme. Die so entnommene Leber wurde mit Konservierlösung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Lagerungszeit, so genannte kalte Ischämiezeit, sollte eine Stunde nicht überschreiten.

### **3.4.3.2 Empfängeroperation: Leberimplantation an der Ratte**

Der Zugang beim Empfängertier war eine mediane Laparotomie vom Processus Xiphoideus bis zur Blase. Die Schritte der Mobilisierung der Leber entsprachen dem Vorgehen bei der Spenderoperation.

Im Leberhilus wurde nach Absetzen der präpylorischen Vene die Pfortader bis zur Gabelung mobilisiert. Die A. hepatica propria und A. gastroduodenalis wurden im Abstand von wenigen Millimetern nach dem Abgang aus der A. hepatica communis ligiert und getrennt. Die A. hepatica communis blieb als Gefäßstumpf stehen.

Der Gallengang wurde im Gebiet seiner Gabelung abgesetzt. Die Vena cava sup. wurde mit einer Satinski-Klemme suprahepatisch geklemmt. Für die anderen Gefäße wurden Mikroclips verwendet. Damit war der Situs zur Ausklemmung der nativen Empfängerleber und Implantation des Transplantates vorbereitet.

Das Transplantat wurde richtig positioniert und optimal für die Transplantation exponiert.

Als erste Anastomose wurde die suprahepatische Vena cava und anschließend die Vena portae genäht. Nach Freigabe der Pfortader färbte sich die Leber sofort homogen und wurde nach einigen Sekunden wieder rosig.

Als Nächstes wurde die infrahepatische Vena cava anastomosiert. Nach Freigabe des Blutstromes – hier mit Rückfluss – des gestauten Blutes aus der unteren Körperhälfte kam es zu einem Anstieg des Herzminutenvolumens, das an einer verbesserten Perfusion der Eingeweide sichtbar wurde. Der Zeitraum zwischen Klemmen und Abklemmen der Pfortader, die so genannte anhepatische Phase, sollte 18–20 Min. nicht überschreiten.

Die Anastomose der A. hepatica erfolgte mit einem Cuff, der aus einem 24G-Venenkatheter zurechtgeschnitten wurde. Die Gallenganganastomose erfolgte ebenfalls mit dem bei der Explantation eingebrachten Stent. Danach wurden die Eingeweide richtig in der Bauchhöhle positioniert und der Operationsschnitt mit 3/0-Dexon vernäht. Durch die Penisvene wurden 2–3 ml Kochsalzlösung gegeben.

Alle Versuchstiere wurden unter einer Wärmelampe in einem Einzelhaltungskäfig mit Wasser und Futter versorgt.

### **3.5 Molekularbiologische, histologische und immunhistochemische Untersuchungen**

#### **3.5.1 Probengewinnung**

Unter Isoflurananästhesie, Lachgas und Sauerstoff wurde mit einem Terumo-24G-Katheter Blut aus der Aorta abdominalis entnommen. Es wurde in Serum-, Li-Heparin und EDTA-Röhrchen getrennt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Die Gewebeproben von Leber und Milz wurden in vorher vorbereitete markierte Röhrchen gefüllt, in flüssigem Stickstoff transportiert und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Außerdem wurden Plastikkassetten mit Leber- und Milzgewebe in Formalin (4%, wässrig, gepuffert) bei Raumtemperatur für 4 Tage fixiert.

### 3.5.2 Materialien, Puffer, Chemikalien für die Untersuchungen

#### 3.5.2.1 Materialien

30% Acrylamid/Bisacrylamid (Biorad) 37.5:1(2.6%)-Stammlösung	1% Ethidiumbromid-Stammlösung 0.01g Ethidiumbromid ad 10 µl Aqua bidest
10% Ammoniumpersulfat(APS): 100mg APS ad 1ml Aqua bidest.	0.5M EDTA-Stammlösung (pH 8.0) (Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure): 93.05g EDTA x 2 H <sub>2</sub> O zu 300 ml H <sub>2</sub> O mit NaOH auf pH8.0 eingestellt ad 500µl Aqua bidest
0.1M Dithiothreitol (GibcoBRL)	10% Natriumdodecylsulfat(SDS): 10g Natriumdodecylsulfat ad 100µl Aqua bidest

**Tabelle 6.** Materialien

#### 3.5.2.2 Puffer

LAEMMLI-ELEKTROFORESEPUFFER: 25MM TRIS(PH8.3) 192MM GLYCIN 0.1% SDS	
10-fach PCR Puffer (Promega)	1.0M Tris/HCl(pH6.8): 121.1 g trisma Base in 800ml H <sub>2</sub> O (mit HCl auf pH 6.8 eingestellt und auf 1l mit Aqua bidest aufgefüllt)
SDS Probenpuffer: 0.5M Tris-HCl(pH6.8) 10% (w/v) SDS 10% (v/v) Glyzerol 5% (v/v) 2-b-Mercaptoethanol 0.05% (w/v) Bromphenolblau	1.5M Tris/HCl(pH8.7): 181.1g Trizma Base in 800ml H <sub>2</sub> O mit 1M HCl auf pH 8.7 eingestellt und auf 1l mit Aqua bidest aufgefüllt
1xTBS-Puffer(tris buffered saline:pH 7.6): 20 mM Tris-(hydrxymethyl)-aminomathan 137mM NaCl	TBS-Puffer mit 0.1% TWEEN: TBS-Puffer 0.1% (v/v) Tween 20

**Tabelle 7.** Puffer

### 3.5.2.3 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid(30%) 37.5:1(2.6),	Biorad
Agarose,	Biorad
Ammoniumpersulfat,	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin,	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau,	Sigmaç
Eindeckmedium,	Roti Histokit
Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure,	GibcoBRL
Hämatoxilin,	Mayers Merc
Hyperfilm ECL,	Amersham
Nitrozellulosemembran 45mm,	Schleicher und Schuell
Protein-Standard High Range,	Biorad
Ponceau S,	Sigma-Aldrich
Sodiumdodecylsulfate,	Sigma-Aldrich
Trizma Base,	GibcoBRL
TRIZOL –Reagenz,	GibcoBRL
Tween 20,	Roth
Whatmanpapier 3MM,	Schleicher und Schuell
Trisma-HCC(Hydrochloride)	Sigma-Aldrich

### 3.5.3 Molekularbiologische Untersuchungen

#### 3.5.3.1 Proteinaufreinigung und -bestimmung

Für die Proteinaufreinigung wurde Ripa-Puffer verwendet. Kurz vor der Verwendung des Ripa-Puffers wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail 1Tb./20ml zugegeben. Das Gewebe wurde mit 0,5ml Ripa-Puffer in 2ml Epis überführt.

Nach Ultravortexen wurden die Röhrchen mit den Proben auf Eis gestellt; diese wurden dann auf Eis 50 Min. inkubiert und bei 14.000rpm 4°C schnell in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Pellets wurden verworfen und der Überstand weiter verarbeitet.

<b>Substanzen</b>	<b>Ripa-Puffer-Konzentration</b>
PBS	100ml
1% Nonident	1g
0.5% Sodiumdeoxycholate	0,5g
0.1% SDS	0,1g
PMSF	10µl
Protease- Tablets	20ml

**Tabelle 8.** Substanzen zur Herstellung des Ripa-Puffers

Die Bradford-Methode ist eine grundlegende Labormethode mit der größten Empfindlichkeit und Spezifität. Sie dient zur quantitativen Proteinbestimmung.

Die hydrophoben Bereiche der Proteine haben eine große Affinität zum Farbstoff BCA-Reagenz A und der 4%CuSO<sub>4</sub>. Die Bindung des Proteins an den Farbstoff verändert das Absorptionsmaximum des Komplexes. Dieser Komplex hat ein Absorptionsmaximum im Bereich von 550–562nm.

Aus dem Überstand der Proben, die auf Eis gelagert wurden, wurden die Proteine isoliert.

Zunächst wurde die Stammlösung von 20mg/ml bovinem Serumalbumin mit Aqua dest. eingestellt. Diese Stammlösung wurde später zu einer Standardreihe mit Konzentrationen von 62,5 -> 125,0 -> 250 -> 500,0 -> 1.000,0µl/ml verdünnt; Leeransatz statt Probe oder Standard mit Aqua dest.

Die Proteinproben wurden mit Aqua dest. im Verhältnis 1:100 verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden 20 µl zusammen mit 300µl des Bradford-Reagenz auf eine „96-well“-Platte pipettiert. Für die richtige quantitative Bestimmung der Proben diente die Standardkurve.

Die notwendige Inkubationszeit der Bradford-Methode betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Proben wurden in einem Photometer bei  $\lambda = 562\text{nm}$  gemessen; die Proteinmenge wurde dann mathematisch berechnet:  $\mu\text{g/ml} \times 100 \text{ VF}$ .

### **3.5.3.2 Die Proteintrennung – SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die bekannten Methoden für die Proteintrennung sind auf drei Kriterien begründet: Oberflächenstruktur, Ladung und Molekülmasse der Biomoleküle.

Das physikalische Prinzip der Elektrophorese ist die Wanderung der Moleküle im elektrischen Feld, abhängig von der Molekulpolarität und dem Gewicht. Die Konzentration des verwendeten Gels beeinflusst diese Proteinbewegung. Die

Laufstrecke der einzelnen Proteine wird mit der Molekülmasse der Proteine verglichen. Für die Visualisierung der Biomoleküle wurde ein Farbstoff verwendet. Die bevorzugte Variante der Elektrophorese für die Proteintrennung war die so genannte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die Mini-Protean II Dual Slab Cell Gelelektrophorese-Kammer (Biorad) benutzt. Das Gel bestand aus einem Trenn- und Sammelgel. Das Sammelgel wurde mit einer Konzentration von 12% Acrylamidgel hergestellt. Die Substanzen für die Herstellung des Gels waren Aqua dest. 3,2ml, Acrylamid 0,5ml, Sammelgelpuffer (0,5 M Tris /HCl[pH 6,8]) 1,25ml, 50µl SDS und 100µl APS, 10µl TEMED.

<b>Substanzen</b>	<b>Acrylamidkonzentration - 12%</b>
Acrylamide	3,2ml
Aqua dest.	0,5ml
Stackinggelpuffer (0.5 M Tris-Base-ph-6.8)	1,25ml
SDS 10%	50µl
APS 10%	100µl
TEMED	10µl

**Tabelle 9.** Substanzen für Herstellung des Sammelgels

Das Trenngel wurde mit einer unterschiedlichen Konzentration von Acrylamid-Trenngel angefertigt. Die Substanzen für seine Herstellung waren Acrylamid 8,0 ml, 6,8 Aqua dest., 5ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl[pH]), 0,2ml 10% SDS, 0,1ml 10%APS, 10µl TEMED.

<b>Substanzen</b>	<b>Acrylamidkonzentration - 12%</b>
Acrylamide	8ml
Aqua dest	6,8ml
Resolvinggelpuffer (1.5 M Tris-Base-ph-8.8)	5ml
SDS 10%	0,2ml
APS 10%	100µl
TEMED	10µl

**Tabelle 10.** Substanzen für Herstellung des Trenngels

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit einer chemischen Reaktion zwischen Acrylamid und Bisacrylamid gestartet. Durch die Polymerisierung der Acrylamideinheiten entstand ein gelartiger Stoff, das Polyacrylamid.

SDS, ein lipophiles Detergenz, bindet sich an Proteine. Der SDS-Proteinkomplex hat eine kugelförmige Gestalt mit stark negativer Ladung.

Zur Herstellung des Gels wurde zunächst das Sammelgel gegossen und nach der Polymerisation das Trenngel darüber gelegt. Die Zeit für die Auspolymerisierung lag zwischen 30–45 Min. Durch einen Kamm im Sammelgel wurden Taschen für die Proben gebildet.

Die Proteine wurden mit reduzierendem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 – 20µl Protein zu 20µl SDS-Probenpuffer – verdünnt. Die Proben wurden 10 Min. bei 95 °C inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Die fertigen Proben wurden in die Geltaschen des Elektrophoresegels pipettiert.

Danach wurde das elektrische Feld mit einer Spannung von 80–100V im Transfer-Elektrophoresepuffer angelegt. Innerhalb kurzer Zeit wurden die Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel konzentriert und langsam, abhängig von Größe und Gewicht, bewegt.

Der gefärbte Protein-Standard SDS-7b und der Protein-Standard-High-Range wurden als molekularer Massenstandard angewendet.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine vom Trenngel auf ein Nitrocellulosepapier übertragen („geblottet“). Das Trenngel wurde vorsichtig von den Glasflächen gelöst und zwischen Lagen von Schwämmen und Filterpapier auf die Membran gelegt. Dieses „Sandwich“ kam in die Blotkammer zusammen mit einem Blotpuffer und es wurde eine Spannung von 100V für 60 Min. angelegt.

Nach gründlichem Waschen mit t.PBS wurden die Membranen in 5% Magermilchpuffer für mindestens 1 Stunde blockiert oder bis zu 24 Stunden bei 4°C. Vor der Primärantikörperinkubation wurde die Negativkontrolle abgetrennt und in Magermilchpuffer oder TBS-Puffer gelegt. Die restliche Membran wurde mit Primärantikörper eine Stunde bei Raumtemperatur oder 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran drei Mal in TBS-Puffer gründlich gewaschen.

Danach wurde die Membran mit entsprechenden Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran noch dreimal in TBS-Puffer gewaschen.

Durch die Behandlung der Membran mit dem ECL-Reagenz<sup>R</sup> (Amersham) und die Detektion der daraus entstehenden Chemilumineszenzstrahlung auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL) wurde die Immunreaktivität aufgezeichnet.

PARP-Produkte, die ein Nachweis für Apoptose bei Westernblot waren, wurden durch Banden in Höhe von 89kDa dargestellt. Es gab auch eine Positiv- (PK) und eine Negativkontrolle (NK).

### **3.6 Histologische Technik**

#### **3.6.1 Hematoxilin-Eosin (H.E.)-Färbung**

Die HE-Färbung wurde als eine Methode zur Visualisierung der Gewebeeränderungen bei einer Abstoßungsreaktion seit Jahren angewendet.

Die gewonnenen Gewebeproben wurden nach Paraffinbettung gekühlt und geschnitten. Die Schnittdicke für die Leberpräparate betrug 4–5µm.

Die Gewebeschnitte wurden auf Aqua dest. bei Raumtemperatur 37°C gelegt und nach kurzer Pause auf einen Objektträger übertragen. Sie wurden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

Die verwendeten Reagenzien für die HE-Färbung waren Hämalaun-Lösung, Eosin-Lösung, Ethanol in den unterschiedlichen Konzentrationen, Leitungswasser.

Die Färbung mit Hämalaun-Lösung dauerte 20 Min. und mit Eosin-Lösung 3 Min.

Die anderen Lösungen und Reagenzien (Ethanol in den unterschiedlichen Konzentrationen, Leitungswasser) waren wesentlich für die Entwässerung, Entparaffinierung der Lebergewebeschnitte und bessere Resorption der Färbemittel im Gewebe. Die Dauer der Färbung betrug ca. 120 Min.

Die Gewebeschnitte wurden mit Deckgläschen und ROTI-Histokit eingedeckt und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

#### **3.6.2 Immunhistochemische Untersuchungen (APAAP-Methode)**

Die Immunhistochemie ist eine Methode, die auf immunologische, histologische und chemische Eigenschaften des Gewebes begründet ist.

Die in den unterschiedlichen Geweben präsentierten Antigene bilden mit Antikörpern einen gemeinsamen Komplex, der durch eine enzymkatalysierte chemische Farbreaktion visualisiert wird.

Die wichtigen Schritte der Immunhistochemie sind: Gewebeschnitt und Fixieren, Blockieren der Proteine, Auftragen der Primärantikörper, Auftragen der Sekundärantikörper, Inkubation mit Streptavidin-alkalischer Phosphatase und Entwickeln.

Die Organe wurden in 5µm dicke Präparate bei -20°C geschnitten und auf Glasobjektträger aufgetragen.

Danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 1–24h getrocknet und 10 Min. in Aceton fixiert.

Nach der Fixierung mussten sie noch 1 Stunde lufttrocknen. Die Schnitte wurden mit Fettstift markiert und mit TBS-Puffer für 10 Min. rehydriert.

Für die Blockierungsschritte wurde ein Blockierungssystem der Firma DAKO (Methode der alkalischen Phosphatase und der biotinierten Antikörper) angewendet.

Auf die Objektträger wurden in folgender Reihenfolge 2–3 Tropfen Avidin und 2–3 Tropfen Biotin hinzugegeben, danach immer in TBS-Puffer für 10 Min. gewaschen.

Nach dem gründlichen Waschen wurde auf die Objektträger der DAKO-Protein-Block für 30 Min. ohne nachfolgendes Waschen aufgetragen.

Das Auftragen der Primär-, Sekundärantikörper und Streptavidin-alkalischen Phosphatase erfolgte in einer feuchten Kammer mit dreimaligem TBS-waschen.

Die Dauer der Inkubationszeit für die Primärantikörper war 60 Min., für die Sekundärantikörper 45 Min. und für die Streptavidin-alkalische Phosphatase 30 Min.

Die Verdünnungen wurden nach Austesten der Antikörper bestimmt, s. Tabelle 12.

Anschließend erfolgt das Entwickeln mit Neufuchsin und Levamisol.

Die Schnitte wurden für 10 Min. inkubiert und gründlich mit Aqua dest. gespült. Für die Gegenfärbung wurde mit Harris-Hämatoxylin für 10 Min. inkubiert. Es folgte Bläuen mit Leitungswasser unter visueller Beurteilung der Färbung.

Zum Abschluss der APAAP-Technik wurde mit Kaiser's Gelatine eingedeckelt. Die Gelatine wurde in einem Wasserglas auf ca. 55°C erwärmt, auf die Objektträger gegeben und mit Glasplättchen luftblasenfrei abgedeckt.

Bei der Bewertung der Intensität der Proben wurde eine vierstufige Skala angewendet: -, +, ++, +++ und bedeuten wie folgt: kein, wenig, mittel, viel.

<b>Name</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Primäre Antikörper</b>		
Biotinilierter Anti-rat RT1 A(a,b) Verdünnung 1:10	Ratte	Pharmingen
Monoklonaler Anti-mouse-CD25 Verdünnung 1:10	Maus	Serotec
<b>Sekundäre Antikörper</b>		
Anti-mouse IgG Verdünnung 1:500	Ziege	Dianova

**Tabelle 11.** Antikörper für Immunhistochemie

### 3.6.3 Detektion der In-situ-Apoptose

Die Apoptose in den Zellen führt zur Bildung unterschiedlicher enzymatischer Produkte. Die Identifikation ist der Nachweis für das Durchlaufen dieses Prozesses. Für diese Versuche wurde eine kombinierte Technik von enzymatischen und immunhistochemischen Methoden (R&D Systems, TA4625, MN, USA) verwendet. Die Kryostatschnitte der Leber wurden mit einem Durchmesser von 5µm Dicke geschnitten, anschließend 2 Stunden bei 37°C getrocknet.

Für die Fixierung wurde Formaldehydlösung für 10 Min. angewendet. Dabei wurden die Schnitte zwei Mal mit PBS gewaschen.

Substanzen	Konzentration
37% Formaldehydlösung	5ml
10xPBS	5ml
DNase freies Wasser	40ml

**Tabelle 12.** Substanzen zur Herstellung der Formaldehydlösung

Danach folgte die Permabilisation mit Proteinase K-Verdau für 15 Min. und TACS-Nuclease für 20 Min. bei 37°C. Die Unterbrechung der Letzte wurde mit der Anwendung von PBS erreicht.

Proteinase K-Verdau	TACS-Nuclease
50µl DNase freies Wasser	50µl TACS-Nuclease Puffer
1µl Proteinase K	1µl TACS-Nuclease

**Tabelle 13.** Substanzen zur Herstellung der Proteinase K-Verdau und TACS-Nuclease

Für die Blockierung der Peroxidase wurde Quenching-Solution von Methanol (45ml) und 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5ml) angesetzt. Die Präparate wurden wieder mit PBS gewaschen.

Für den Puffer wurde TdT Labeling buffer und Aqua dest. benutzt. Dann folgte der Labeling-Reaktion-Mix bei 37°C für 1 Stunde.

Zum Stoppen dieser Reaktion wurde wieder TdT-Stop-Buffer und Aqua dest. bevorezogen .

Substanzen	Volumen
TdT-dNTP	1µl
Co-Stock	1µl
Mn-Stock	1µl
TdT-Enzyme-Tack	1µl
TdT – Labeling - B	50µl

**Tabelle 14.** Substanzen für Herstellung der Labeling Reaktion Mix

Für die Detektion wurden die Präparate mit Strept.-HRP-Detect. Lösung, die 50µl PBS und 1µl Streptavidin-HRP enthielt, für 10 Min. inkubiert und später mit PBS gewaschen.

Für die Färbung wurde „DAB-Working-Solution“ (Tab. 15) für 10 Min. benutzt und danach mikroskopisch begutachtet. Dann folgte für 10 Sek. eine Gegenfärbung mit Methylgrün mit anschließendem Schwenken in Aqua dest..

<b>Substanzen</b>	<b>Konzentration</b>
PBS	50µl
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50µl
DAB	250µl

***Tabelle 15. Substanzen für Herstellung der DAB-Working-Solution***

Am Ende wurden die Präparate mit Ethanol in Konzentrationen von 70%, 95%, 100%, einer so genannten Ethanolreihe, und Xylol für 1 Min. inkubiert. Der letzte Schritt war ein sog. „Eindeckeln“ mit Entelan.

### **3.7 Statistik**

Das verwendete statistische Programm war SPSS Software Paket Version 10.0 (SPSS Corp., Birmingham, AL, USA). Die Analyse der Angaben erfolgte als Median und Spannweite.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Klinischer Verlauf nach Lebertransplantation

Die transplantierten Tiere wurden in Einzelkäfigen untergebracht. Die Aufwachphase dauerte 2–4 Stunden. Nach dem Aufwachen bekamen die Tiere freien Zugang zu Wasser und Nahrung.

Die Gewebe der Tiere wurden auf histologische, molekularbiologische und immunhistochemische Veränderungen untersucht und semiquantitativ ausgewertet.

Die Tötungszeitpunkte für die Untersuchungen waren an den Tagen 6, 12 nach Transplantation bzw. mit dem Todeszeitpunkt der Tiere.

Die Anzahl der untersuchten Tiere betrug für alle Untersuchungen drei pro Tag (außer für die In-situ-Apoptose-Detektion, n=2).

### 4.2. Überlebenszeit

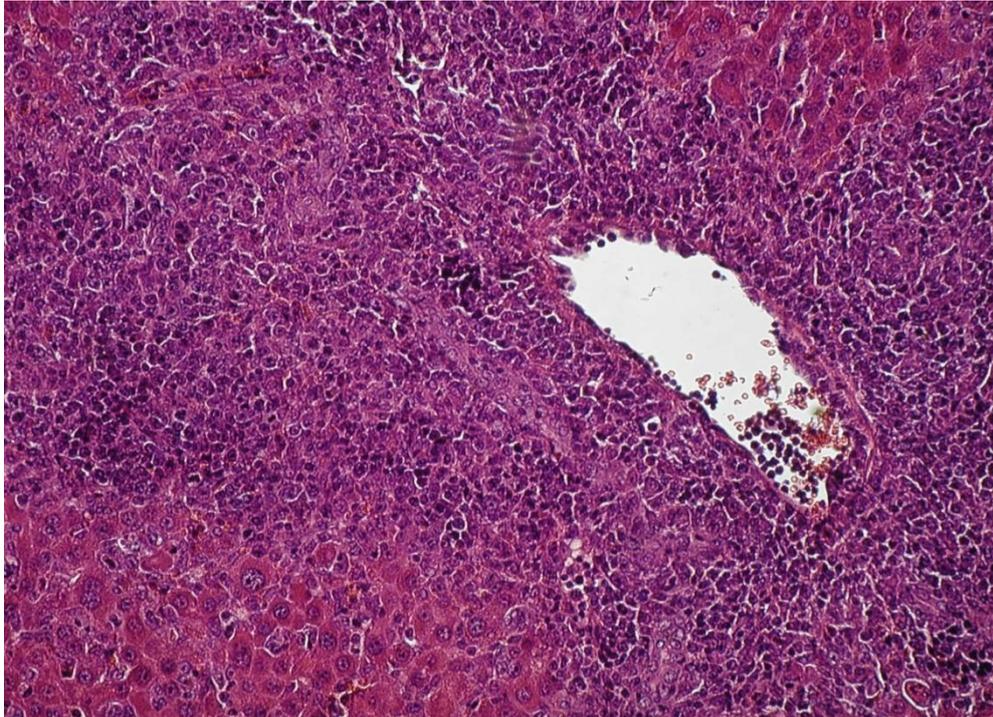
Die Überlebenszeit der Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung lag im Median bei 10 Tagen (Spannweite 8-12 Tage). Es entwickelte sich regelhaft eine ausgeprägte Abstoßungsreaktion mit Leberinsuffizienz, Splenomegalie und in manchen Tieren eine gastrointestinale Blutung. In der nur mit Zellen behandelte Gruppe 2 zeigte sich klinisch ein ähnliches Bild, allerdings ergab sich hier ein deutlich verbessertes Langzeitüberleben mit einem Median von 18 Tagen. Die Überlebenszeit der Gruppe 3, der nur mit CTLA-4Ig vorbehandelten Tiere, lag zwischen 14–150 Tagen. Hier ergab sich bei über der Hälfte der Tiere nach unserer Definition ein Langzeitüberleben. Erst in der kombiniert vorbehandelten Gruppe (DA-Spenderzellen und CTLA-4Ig) überlebten alle Langzeittiere den Zeitraum von 150 Tagen (Tabelle 16).

<b>Gruppe</b>	<b>n</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Überleben [Tage]</b>	<b>Median</b>
1	7	Kontrollgruppe	8,10,10,10,11,11,12	10
2	7	DA-Zellen	10,15,15,18,20,21,90	18
3	7	CTLA-4Ig	14,16,16, n=4 >150	150
4	7	DA-Zellen+CTLA-4Ig	7>150	150

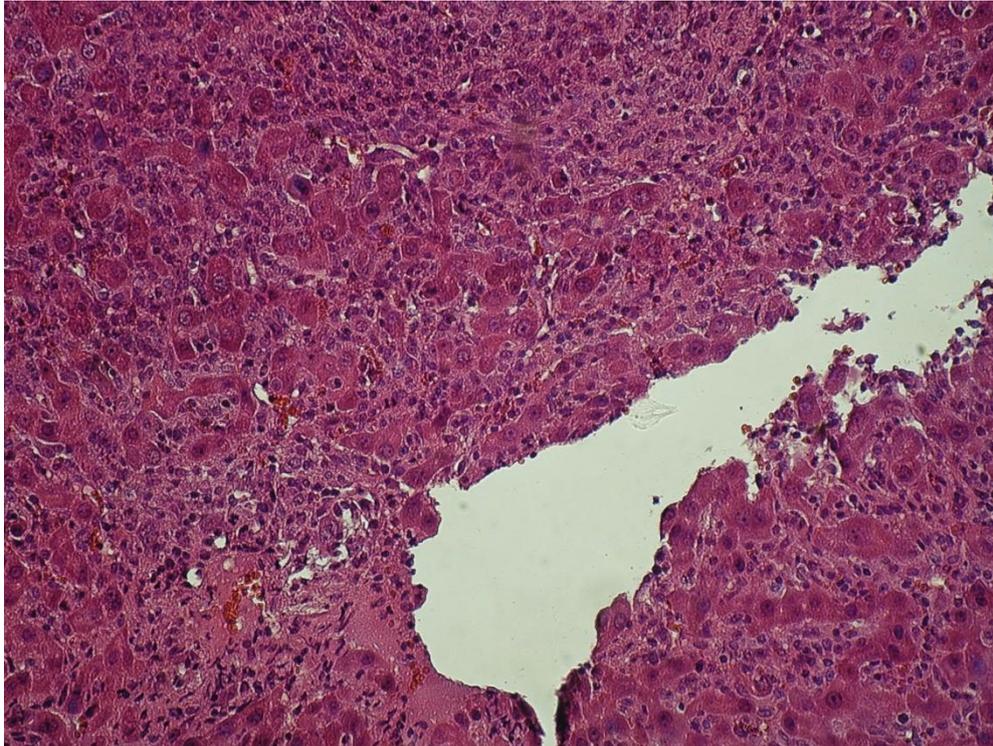
**Tabelle 16.** Individuelle Überlebenszeiten in den einzelnen Behandlungsgruppen

### 4.3. Histologische Veränderungen

Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten bereits am 6. Tag eine ausgeprägte Abstoßungsreaktion (Abbildung 4A). Es handelte sich um Nekrosen der Hepatozyten, Gallengangsläsionen, mononukleäre Zellinfiltration. An den Tagen 10-12 zeigten sich flächige Parenchymnekrosen und ausgeprägte Gallengangsepithelalterationen (Abbildung 4B)

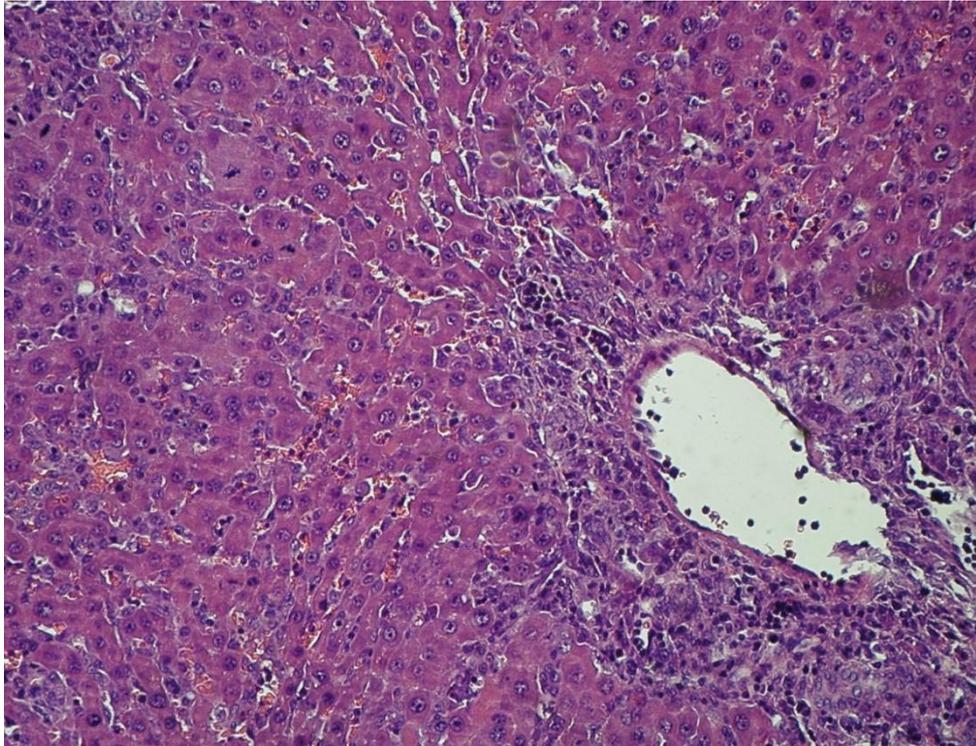


**Abbildung 4A.** (H.E. Färbung, x20) Histologie der Leber im Verlauf der akuten Abstoßung nach allogener ORLT im unbehandelten Tier. Am 6. Tag ausgeprägte mononukleäre Infiltration, Gallenwegsläsionen und Einzelzellnekrosen der Hepatozyten.



**Abbildung 4B.** (H.E. Färbung, x20) Histologie der Leber im Verlauf einer akuten Abstoßung nach allogener ORLT im unbehandelten Tier (Tag 11). Es zeigen flächige Parenchymnekrosen und ausgeprägte Gallenwegsepithelalterationen.

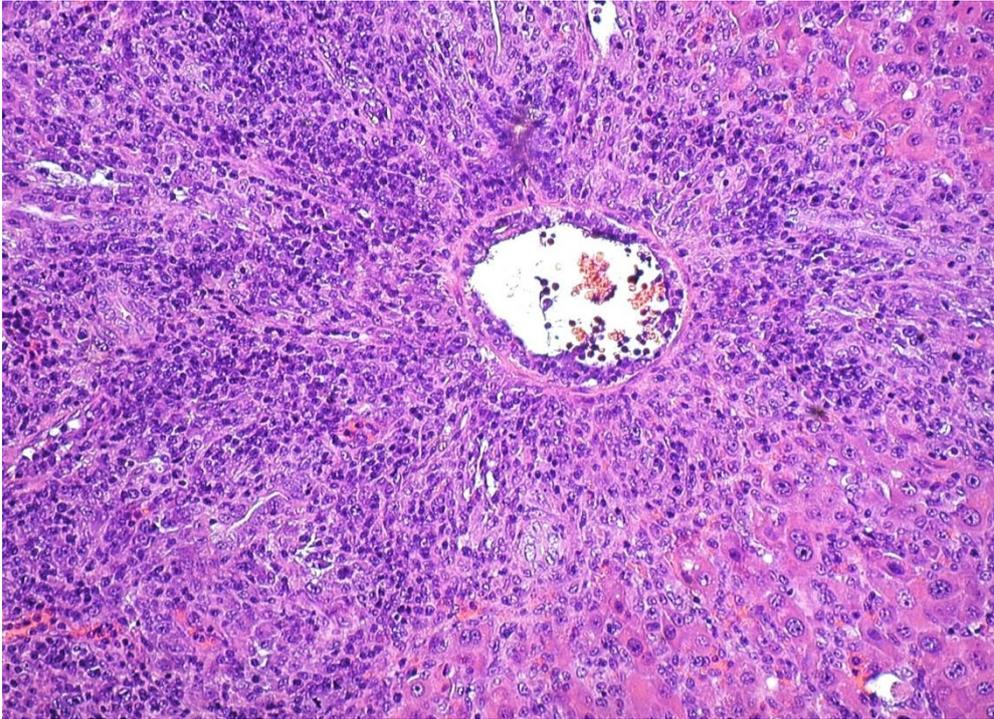
In den Lebertransplantaten der Gruppe 2 zeigte sich am 6 postoperativen Tag ein starkes periportales Infiltrat, das sich auch auf die gesamten Sinusoide erstreckte. Bei einigen Tieren führte das am Tag 12 zu konfluierenden Nekrosen der Hepatozyten, Gallengangsproliferationen und Lymphozyteninfiltration, was dem Bild einer drittgradigen Rejektion entspricht (Abbildung 5).



**Abbildung 5.** (H.E. Färbung, x20) Histologie der Leber eines Tieres nach allogener Lebertransplantation mit Spender-Splenozyten-Vorbehandlung, das nach 12 Tagen eine Abstoßung mit konfluierenden Nekrosen aufwies.

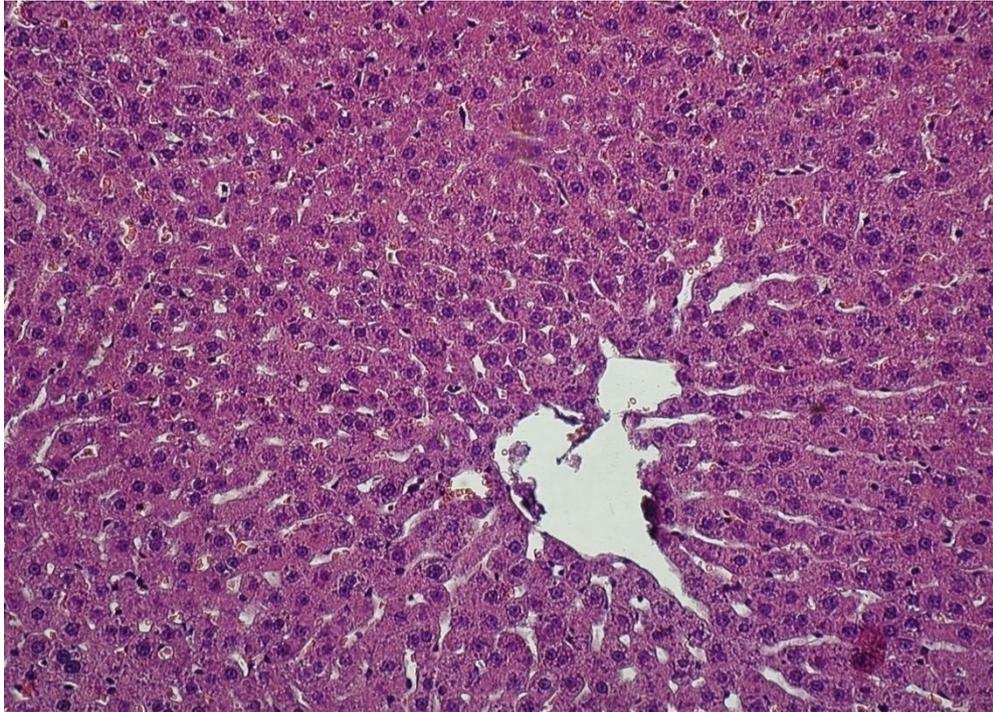
In der Gruppe 3 zeigte sich trotz des besseren klinischen Verlaufs und Überlebens bereits am sechsten Tag ein starkes periportales Infiltrat, welches sich ebenfalls diffus bis in die Sinusoide erstreckte. Im weiteren Verlauf (Tag 12) persistierte dieses ausgeprägte lymphozytäre Infiltrat, und es zeigten sich eine Vielzahl an nekrotischen Hepatozyten.

Die histologische Beurteilung der Leber von Langzeittieren (n=4) mit über 150 Tagen Überlebenszeit zeigte typischerweise chronische immunologische Veränderungen mit Gallenwegsproliferationen und mononukleären Infiltraten.



**Abbildung 6.** (H.E. Färbung,x20) Histologie der Leber eines Tieres am Tag 12 nach Lebertransplantation mit CTLA-4Ig-Vorbehandlung. Ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat mit nekrotischen Gewebearealen.

Bei den Tieren in der Gruppe 4 zeigten sich in der Histologie der Leber am sechsten postoperativen Tag ähnliche Ergebnisse wie bei anderen Gruppen. Allerdings waren diese Veränderungen bereits am Tag 12 deutlich rückläufig und schließlich bei den Tieren mit über 150 Tagen Überlebenszeit nicht mehr nachweisbar. Hier zeigte sich ein nahezu unauffälliges Lebergewebe (Abbildung 7).



**Abbildung 7.** (H.E. Färbung, x20) Histologie der Leber eines Tieres mit Spender-Splenozyten- und CTLA-4Ig Vorbehandlung nach 150 Tagen. Es zeigt sich eine unauffällige Gebebearchitektur ohne inflammatorische Infiltrate oder Zeichen von Fibrose.

#### **4.4 Apoptose Nachweise**

##### **4.4.1 Apoptose Nachweise durch PARP-Western Blot**

Die PARP Produkte waren in der Kontrollgruppe am Tag 6 nach der Transplantation schwach ausgeprägt. Die drei vorzeitig getöteten Tiere (an den Tagen 10, 11, 12) zeigten eine mittlere Expression von PARP-Produkten.

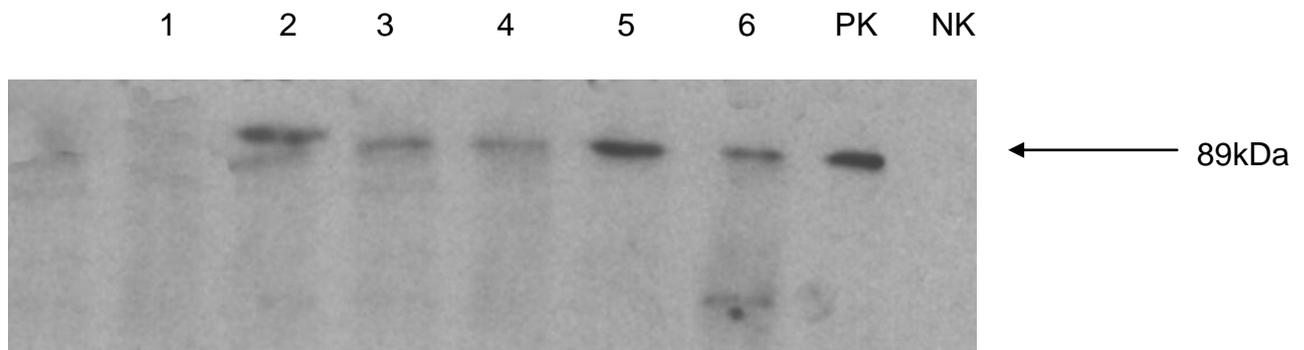
Die PARP Produkte im Western-blot waren in der Gruppe 2 am Tag 6 nach der Transplantation ohne wesentliche Ausprägung. Am Tag 12 nach ORLT zeigte die PARP Färbung eine mittlere schwach positive Intensität. Bei den Langzeittieren wurden ebenfalls Apoptosebanden festgestellt. Die Intensität der Expression war hier ebenfalls mittel bis schwach.

PARP-Banden fanden sich in der Gruppe 3 mit CTLA-4Ig-Vorbehandlung am Tag 6 nach der Transplantation deutlicher als am Tag 12. Bei den Langzeittieren, die über 150 Tage überlebt hatten, waren sie wiederum nur einmal schwach nachweisbar.

Ein PARP-Nachweis in der Gruppe 4 konnte deutlich am Tag 6 und Tag 12 nach der Transplantation festgestellt werden. Die Intensität der Expression von PARP-Banden wurde als mittel bewertet, aber bei den Langzeittieren nur noch schwächer beobachtet.

Gruppe	Vorbehandlung	Tag 6	Tage 10, 11 und 12	LZT
1	Kontrollgruppe	-/-/+	++ /++/++	-
2	DA-Zellen	-/-/+	-/+/+	+ /+ /++
3	CTLA-4Ig	+ /+ /++	- /+ /+	- /- /+
4	DA-Zellen + CTLA-4Ig	++ /++ /++	++ /++ /++	- /- /+

**Tabelle 17.** Expression von PARP Produkten in der Kontrollgruppe, Gruppe 2, 3 und 4. Drei Tiere wurden am Tag 6, Tag 12 und am Tag 150 (LZT) nach der Transplantation untersucht und semiquantitativ ausgewertet (-/keine, +/wenig, ++/mittel, +++/hohe Expression).



**Abbildung 8.** PARP-Western-Blot im Lebergewebe nach allogener ORLT. In Höhe der 89 kDa fanden sich beim Kontrolltier am Tag 6 keine Apoptosezeichen im PARP-Western-Blot (1). Banden stellten sich bei mit CTLA-4Ig und DA-Zellen behandelten Tieren am Tag 6 (2) und Tag 12 (3) dar. Auch Langzeittiere dieser Gruppe zeigten Banden nach mehr als 150 Tagen (4-6) nach ORLT. PK stellte die Positivkontrolle und NK die Negativkontrolle dar.

#### 4.4.2 Apoptose Nachweise durch In-Situ-Apoptose Detektion

Die in-situ Apoptose-Detektion in den transplantierten Lebern von Gruppe 1 zeigte keine apoptotischen Kerne am Tag 6 bei den beiden untersuchten Tiere. Wegen des vorzeitigen Todes der Tiere konnten nur jeweils ein Tier am Tag 11 und 12 ausgewertet werden. Diese Tiere zeigten eine schwache und mittlere Intensität der Expression.

Der in-situ Apoptosenachweis in der Leber von Gruppe 2, 3 und 4 bestätigte die Ergebnisse des Western-blots.

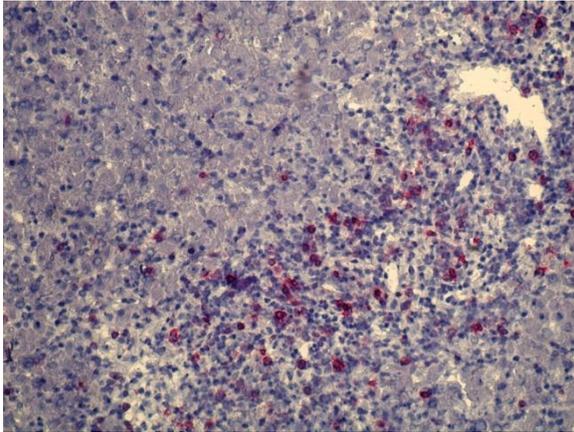
<b>Gruppe</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Tag 6</b>	<b>Tage 11/ 12</b>
<b>1</b>	<b>Kontrollgruppe</b>	<b>-/-</b>	<b>+ / ++</b>
<b>2</b>	<b>DA-Zellen</b>	<b>-/-</b>	<b>+ / +</b>
<b>3</b>	<b>CTLA-4Ig</b>	<b>- / +</b>	<b>+ / ++</b>
<b>4</b>	<b>DA-Zellen + CTLA-4Ig</b>	<b>+ / ++</b>	<b>+ / ++</b>

**Tabelle 18.** In-Situ-Apoptose-Detektion in der Kontrollgruppe, sowie Gruppen 2, 3 und 4, je drei Tiere wurden am Tag 6, Tag 12 und am Tag 150 (LZT) nach der Transplantation untersucht und semiquantitativ ausgewertet (-/keine, +/wenig, ++/mittel, +++/hohe Expression)

#### 4.5 CD25-Expression (Interleukin-2-Rezeptor)

##### 4.5.1 CD25-Expression (Interleukin-2-Rezeptor) in der Leber

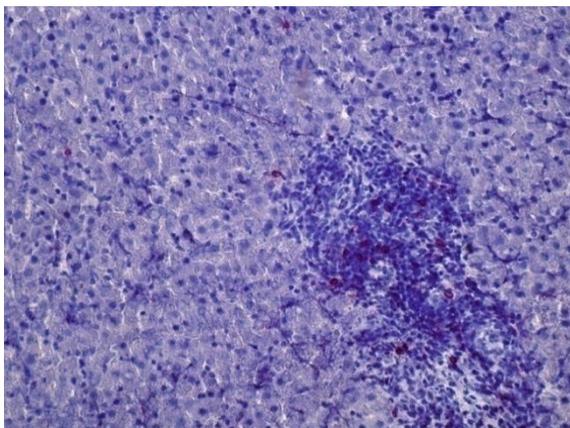
In der Kontrollgruppe war die Proteinexpression von CD25 in der Leber deutlich ausgeprägt. Alle Tiere zeigten hier am Tag 6 stark positive Ergebnisse. Es wurde ein globales Infiltrat sowohl der Portalfelder als auch der Sinusoide mit CD25 positiven Zellen gefunden, die sich auch an den Tagen 10, 11 und 12 weiter zeigte. Bei einem von diesen späteren Tieren wurde nur eine mittlere Expression, bei den anderen zwei jedoch eine hohe Expression von CD25 gefunden.



**Abbildung 9.** Immunhistochemie der Leber (mit anti-CD25 x 20, Serotec) zeigt einen deutlichen Nachweis CD25 positiver Zellen in einem Kontrolltier (Gruppe 1) am 6. postoperativen Tag.

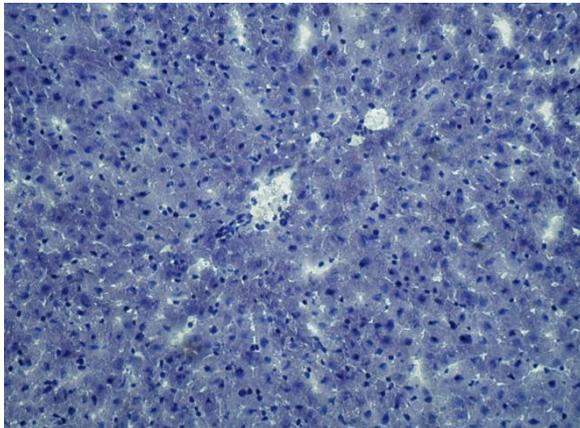
In der Gruppe 2 fand sich am Tag 6 nach Transplantation ebenfalls ein globales Infiltrat CD25 positiver Zellen, ebenfalls in den Portalfeldern und Sinusoiden. Diese vorbehandelten Tiere zeigten auch am Tag 12 und den Langzeittieren eine starke CD25-Ausprägung.

In der Gruppe 3 zeigte sich an den Tagen 6 und 12 nach Transplantation nur eine geringe Ausprägung einer CD25 Proteinexpression. Bei den Langzeittieren fanden sich dann nur noch vereinzelt CD25-positive Zellen im Leberparenchym.



**Abbildung 10.** Immunhistochemie der Leber (mit anti-CD25 x 20, Serotec) zeigt am 12. postoperativen Tag eine nur geringe CD25-Expression bei einem mit CTLA-4Ig vorbehandelten Tier (Gruppe 3)

In der Gruppe 4 war die Proteinexpression von CD25 in der Leber am Tag 6 und 12 ebenfalls nur schwach ausgeprägt. Bei den Langzeittieren fanden sich ähnlich wie in Gruppe 3 nur noch vereinzelt CD25-positive Zellen im Leberparenchym.



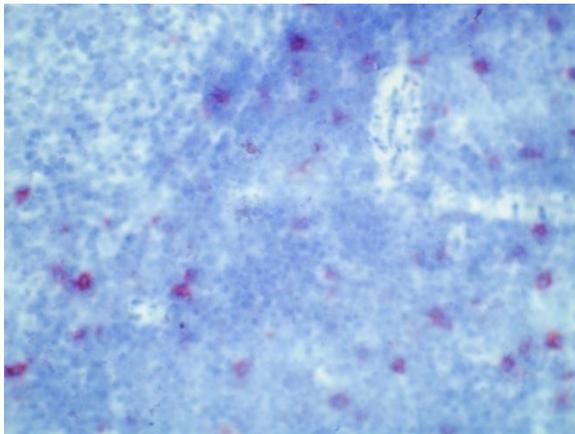
**Abbildung 11.** Immunhistochemie der Leber (mit anti-CD25 x 20, Serotec). Mehr als 150 Tage nach allogener Transplantation und Vorbehandlung mit spenderabgeleiteten DA-Milzzellen und CTLA-4Ig (Gruppe 4) zeigt sich lediglich eine schwache CD25 Expression

Gruppe	Vorbehandlung	Tag 6	Tage 10,11, und 12	LZT
1	Kontrollgruppe	+++ /+++ /+++	++ /+++ /+++	-
2	DA-Zellen	+ /+ /++	++ /+++ /+++	++ /+++ /+++
3	CTLA-4Ig	++ /++ /+++	++ /++ /+++	++ /++ /++
4	DA-Zellen+CTLA-4Ig	+ /+ /+	- /- /+	- /- /+

**Tabelle 19.** CD25-Expression in der Leber (Immunhistochemie anti-CD25) in der Kontrollgruppe, sowie Gruppen 2, 3, 4. Jeweils drei Tiere wurden an den Tagen 6, 12 und 150 (LZT) nach Transplantation untersucht und semiquantitativ ausgewertet (- keine, + wenig, ++ mittlere, +++ hohe Expression).

#### 4.5.2 CD25-Expression (Interleukin-2-Rezeptor) in der Milz

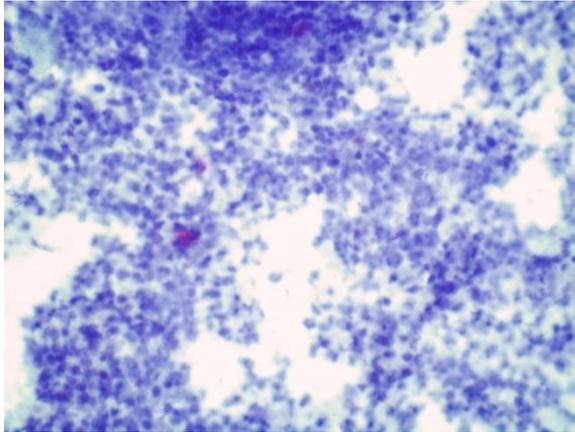
Die Kontrollgruppe zeigte am Tag 6 nach Transplantation in der semiquantitativen Auswertung in über 60 % der Proben eine starke CD25-Expression. Die gleiche Gruppe zeigte an den Tagen 10, 11 und 12 zwar auch positive CD25-Färbungen, jedoch mit einer nur noch mittleren Intensität.



**Abbildung 12.** Immunhistochemie der Milz (mit anti-CD25, x20, Serotec) zeigt in der Kontrollgruppe am Tag 6 einen Nachweis vieler CD25 positiver Zellen

In der Gruppe 2 (DA Vorbehandlung) war die CD25 Expression in der Milz zu allen Untersuchungszeitpunkten (Tag 6, 12 und LZT) nur schwach ausgeprägt.

In der Gruppe 3 (DA und CTLA4Ig) war die CD25 Expression an den Tagen 6 und 12 zwischen schwach und mittel ausgeprägt. Im Verlauf fanden sich bei den LZT dann wieder stark CD25-positive Zellen im Milzparenchym.



**Abbildung 13.** Immunhistochemie der Milz (mit anti-CD25, x20, Serotec). Nur geringe Anfärbungen CD25-positiver Splenozyten am Tag 6 nach ORLT bei mit CTLA-4Ig und DA-Splenozyten vorbehandelten Ratten (Gruppe 4)

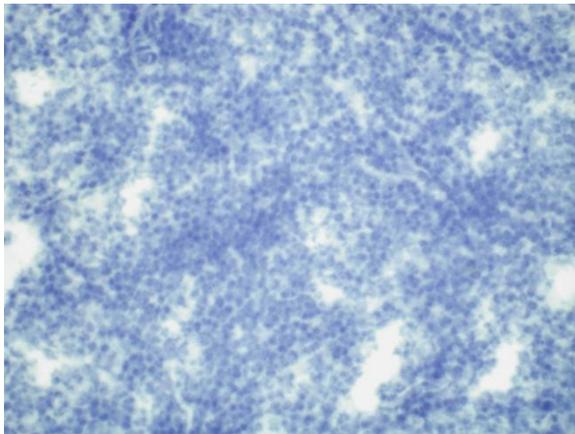
In der Gruppe 4 wiesen die Proteinexpression von CD25 in der Milz am Tag 6 und Tag 12 nach der Transplantation unterschiedliche Intensität auf. Am Tag 6 hatten zwei Tiere eine negative CD25-Expression. Am Tag 12 waren alle Ergebnisse positiv. Dabei waren über 60% der Proben von mittlerer Intensität und ein Drittel schwach positiv. Bei den LZT fanden sich vereinzelt CD25-positive Zellen im Milzparenchym. Bei einem Tier war diese Rezeptor-Expression negativ und bei zwei schwach positiv.

<b>Gruppe</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Tag 6</b>	<b>Tag 10,11 und 12</b>	<b>LZT</b>
1	Kontrollgruppe	++/+++/>+++	++/+++/>++	-
2	DA-Zellen	+/>+/>++	+/>+/>++	+/>+/>++
3	CTLA-4Ig	+/>+/>++	+/>+/>++	++/+++/>+++
4	DA-Zellen+CTLA-4Ig	-/>-/>+	+/>+/>++	-/>-/>+

**Tabelle 20.** CD25-Expression in der Milz (Immunhistochemie anti-CD25) in den einzelnen Gruppen. Jeweils drei Tiere wurden an den Tagen 6, 12 und 150 (LZT) nach Transplantation untersucht und die Färbungen semiquantitativ ausgewertet (- keine, + wenig, ++ mittlere, +++ hohe Expression).

#### 4.6 Chimärismus

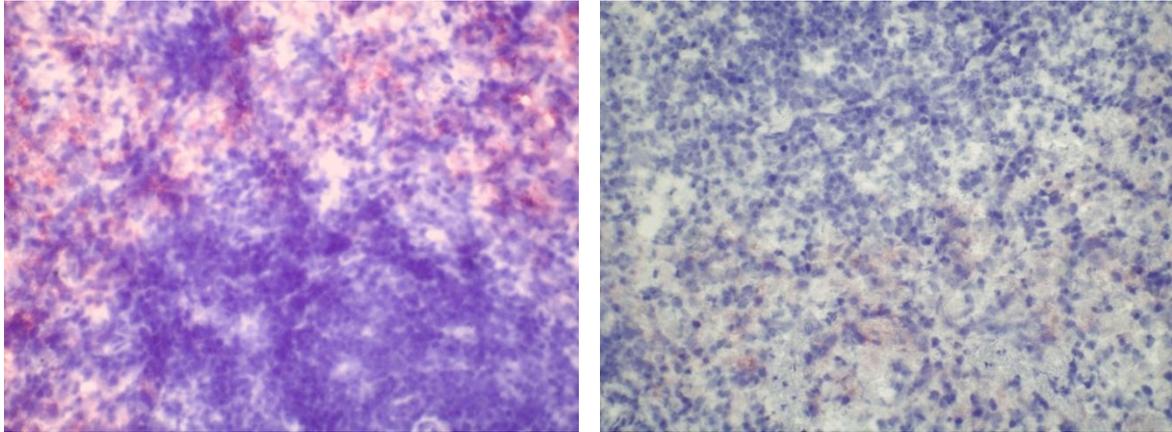
In der Kontrollgruppe zeigte sich am Tag 6 nur ein schwacher Nachweis spenderabgeleiteter Zellen in den Empfänger Milz. Lediglich 30% der Proben waren überhaupt und dann mit insgesamt mittlerer Intensität positiv. An den Tagen 10, 11 und 12 fanden sich keine DA-spezifischen Anfärbungen im Gewebe mehr.



**Abbildung 14.** (Immunhistochemie anti-rat RT1A<sup>a,b</sup>, x20) Nachweis spenderabgeleiteter Zellen in der Milz von Empfängern einer allogenen ORLT. Bei Kontrolltieren war schon nach 12 Tagen keine spenderabgeleiteten Zellen mehr nachweisbar.

In der Gruppe 2 waren spenderabgeleitete Zellen in der Milz am Tag 6 nach ORLT in allen untersuchten Tieren schwach vorhanden. Nach 12 Tagen fanden sich diese nur noch vereinzelt bei einem Tier, und bei den LZT blieben diese Färbungen wiederum negativ.

Im Gegensatz dazu war in der Gruppe 3 der Nachweis von Spenderzellantigen am Tag 6 deutlich ausgeprägt. Am Tag 12 und bei den LZT fanden sich aber auch hier nur noch bei zwei Dritteln der Tiere ein wenig ausgeprägter Nachweis spenderabgeleiteter Zellen.



**Abbildung 15.** (Immunhistochemie anti-rat RT1A<sup>a,b</sup>, x20). Nachweis von spenderabgeleitetem Antigen bei mit CTLA-4Ig und DA-Splenozyten vorbehandelten Tieren am Tag 12 und im Langzeitverlauf.

In der Gruppe 4 war die Proteinexpression spendergenerierter Zellen in der Milz am Tag 6 zwar deutlich vorhanden, nach 12 Tagen fand sich aber nur noch eine geringere Intensität und bei den LZT gab es schließlich nur vereinzelt Nachweise dieser spezifischen Proteine. Die Ergebnisse waren bei zwei Tieren schwach positiv und bei einem Tier negativ.

<b>Gruppe</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Tag 6</b>	<b>Tag 10, 11 und 12</b>	<b>LZT</b>
1	Kontrollgruppe	-/-/++	-/-/-	-
2	DA-Zellen	+ /+ /+	- /- /+	- /- /-
3	CTLA-4Ig	++ /++ /+++	- /- /+	- /- /+
4	DA-Zellen+CTLA-4Ig	+++ /+++ /+++	++ /++ /+++	- /+ /+

**Tabelle 21.** Expression von Spender-MHC-I in der Milz der Empfänger in den einzelnen Gruppen. Jeweils drei Tiere wurden an den Tagen 6, 12 und 150 (LZT) nach Transplantation untersucht und semiquantitativ ausgewertet (- keine, + wenig, ++ mittlere, +++ hohe Expression).

## **5. Spezifische Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung**

### **1. Wie beeinflusst die Vorbehandlung mit einem adoptiven Zelltransfer die akute Abstoßung eines Transplantats?**

*Die Anwendung der einfachen Vorbehandlung mit Spender-Zellen(DA) konnte eine akute Reaktion gegen das Transplantat nicht vermeiden. Es zeigte sich eine ausgeprägte CD25-Expression mit Apoptose sowie der Nachweis einzelner spenderabgeleiteter Zellen in Leber und Milz.*

### **2. Wie beeinflusst die Vorbehandlung mit CTLA-4Ig die akute Abstoßung des Transplantats?**

*Die Vorbehandlung mit CTLA-4Ig führte zu einer Verlängerung der Überlebenszeit, zur Reduktion einer Immunreaktion und zu einer Verminderung der CD25R-Expression. Apoptose-Rate und das Phänomen des Chimärismus waren hierbei nicht stark ausgeprägt.*

### **3. Ist eine kombinierte Therapie mit CTLA-4Ig und spendergenerierten Zellen sinnvoll?**

*Die Vorbehandlung mit DA-Zellen und CTLA-4Ig führte zu einer Langzeitakzeptanz des Transplantats bei allen Tieren. Dieses ging einher, mit einem Nachweis von Chimärismus, einer Verminderung der CD25R-Expression, einer Erhöhung der Apoptose-Rate und einer generellen Reduktion von Abwehrprozessen.*

## **6. Diskussion**

### **6.1 Toleranzinduktion - Mechanismen der Toleranzentwicklung**

Da bei der Gabe von immunsuppressiv wirksamen Medikamenten insbesondere im Langzeitverlauf zunehmend unerwünschte Wirkungen wie Nephrotoxizität oder Stoffwechselstörungen auftreten, gibt es neben vielen Studien zur Optimierung immunsuppressiver Protokolle auch eine Reihe experimenteller Versuche eine spezifische Toleranz unter Vermeidung einer dauerhaften Immunsuppression zu erreichen (52).

Toleranz wird dabei definiert als die Duldung körperfremden Antigenmaterials (so genannte Tolerogene) durch das eigene Immunsystem. Toleranz ist damit ein aktiver Prozess, der sowohl im Thymus aber auch in der Peripherie ablaufen kann (53).

Der Begriff der Toleranz wurde von Burnet und Ferner in 40iger Jahren eingeführt (15).

Eine Toleranzentwicklung in der Peripherie kann über mehrere Mechanismen verlaufen. Diese bezeichnet man als: Deletion (klonale Erschöpfung), Ignoranz und Sequestrierung (81).

Darüber hinaus gehören zur Toleranzentwicklung Prozesse wie: Anergie, Apoptose und Suppression (1).

Anergie definiert den funktionellen Status der Hyporeaktivität, der in der Regel durch den Verlust des zweiten Signals der Signaltransduktion bewirkt wird, was wiederum zu einer gestörten T-Zellen- Proliferation mit reduzierter IL-2-Sekretion führt (24).

Apoptose von T-Zellen bezeichnet in Abgrenzung zur Nekrose den Zustand eines so genannten programmierten Zelltodes (1).

Aktive Regulation (Suppression) wird durch T-Zellen, die zu regulatorischen T-Zellen differenzieren, vermittelt (1).

In dieser Arbeit wurden von allen bekannten Toleranzmechanismen nur die beiden Aspekte Anergie und Apoptose betrachtet.

Entsprechend der oben genannten Mechanismen der Toleranz ergeben sich verschiedene Ansätze, Toleranz unter experimentellen Bedingungen zu untersuchen.

### **6.2 Zelluläre Mechanismen der Toleranzentstehung**

Nach Waldmann gründen sich die Ansätze zur Induktion von Toleranz auf der Amplifikation und Modulation der ablaufenden Abstoßungsreaktion, ihrer Stadien und deren Signaltransduktion (77).

Eine Rejektion verläuft in drei Stadien, die durch drei Signale, die so genannte Signaltransduktion, vermittelt werden. Das erste Signal verläuft antigen-spezifisch zwischen antigen-präsentierenden Zellen (APC) und T-Zellen. Das zweite Signal ist antigen-unspezifisch und wird durch CD28/CD40 und andere Rezeptormoleküle vermittelt, die auf APC und T-Zellen exprimiert sind(9, 16,19). Ein drittes Signal stellt die Zytokinfreisetzung von T-Zellen dar. Diese Zytokine regulieren dann die T-Zell-Expansion (13).

In mehreren Studien ist bereits eine Blockierung dieser Signale durch die einzelne oder kombinierte Anwendung von antiCD4-, antiCD8-, antiCD52-Antikörpern für die Entwicklung von Toleranz beschrieben worden (77,81). Damit konnte gezielt eine Interaktion der Rezeptoren zwischen APC und T-Zellen unterbrochen und als Folge davon ein oder zwei Schritte in der Signaltransduktion blockiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem tierexperimentellen Transplantations- und Rejektionsmodel der Einfluss einer CTLA-4Ig Applikation untersucht. Dieser Antikörper blockiert ebenfalls den zweiten Schritt der Signaltransduktion, die so genannte Co-Stimulation, und kann so eine T-Zell-Antwort supprimieren.

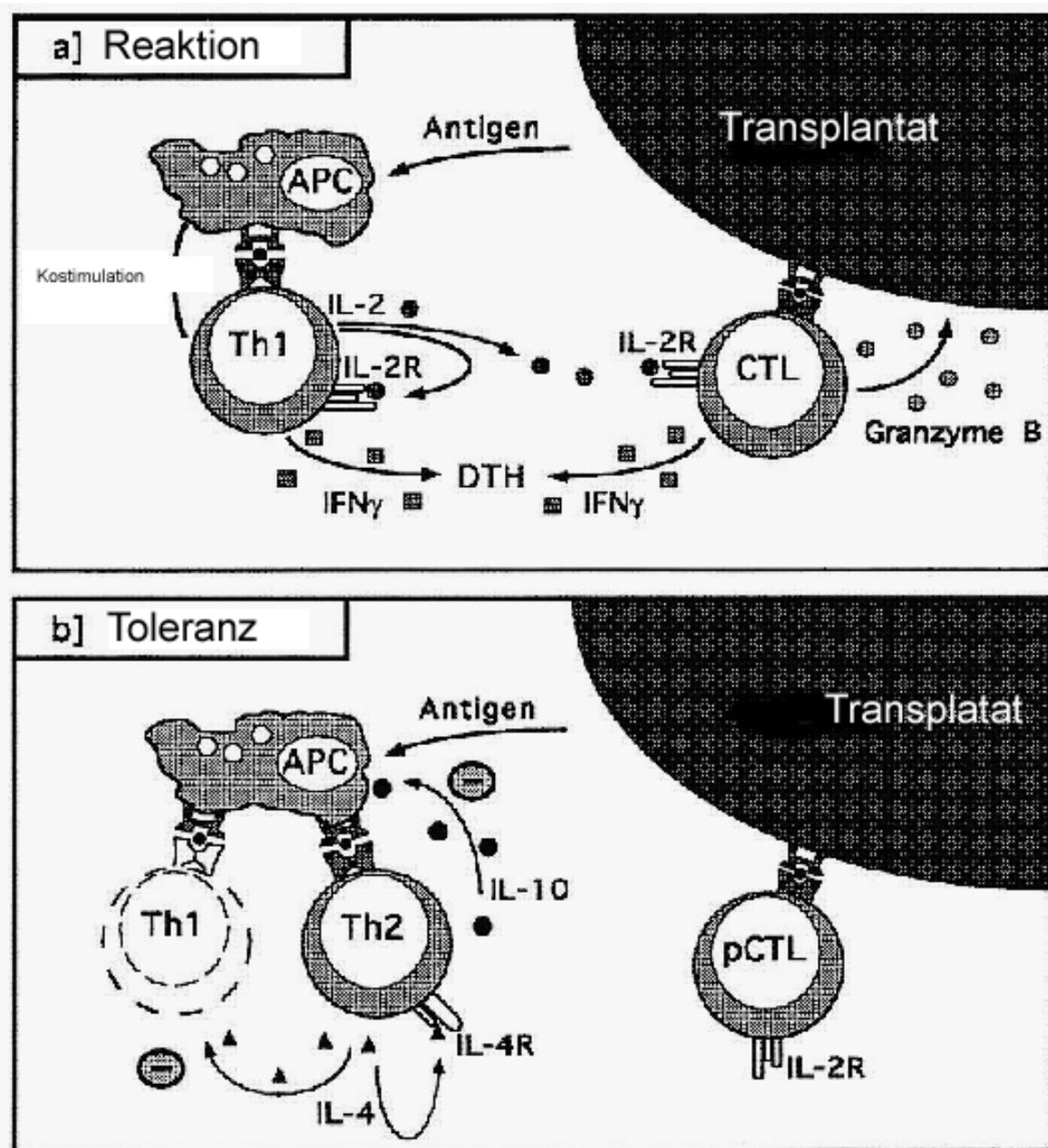
Diese Blockade der Co-Stimulation kann sogar zu einer so genannten spezifischen Toleranz führen, weil es nicht nur das costimulatorische Signal unterbricht, sondern auch eine Anergie und Apoptose von T-Zellen bedingen kann (7).

Nach neueren Ergebnissen (60) gelingt es, die Entwicklung von Toleranz nicht nur durch die Blockade der Signaltransduktion, sondern auch durch die begleitende adoptive Zelleninfusion als Therapieansatz zu nutzen (78).

Diesbezüglich gibt es in unserer Studie eine Untersuchungsgruppe, bei der nicht nur die T-Zell Interaktion durch Antikörperblockade gehemmt wurde, sondern auch eine Behandlung mit spenderabgeleiteten Milzzellen erfolgte.

Ein solcher zusätzlicher adoptiver Zelltransfer wird von einigen Autoren (10,80) als ein viel versprechender Ansatz gesehen.

Für eine gezielte Anwendung einer solchen Zellinfusion war es zunächst notwendig, die relevanten Zellpopulationen und Mengen herauszufinden, mit der man in Kombination mit einer CTLA-4Ig Applikation eine signifikante funktionelle Beeinflussung der Alloreaktivität des Empfängers nach Transplantation erreichen kann.



**Abbildung 16.** Schematische Zusammenfassung der Signaltransduktion während einer Abstoßungsreaktion (a) im Vergleich zur Signaltransduktion in der Toleranzentwicklung (b), (nach Nickerson et al. (50))

### 6.3 Spezielle Aspekte der Leber bei der Entstehung von Toleranz

Die Leber eignet sich aus vielen Gründen besonders gut zur Untersuchung einer Abstoßung, da sie ein „immunologisch begünstigtes Organ“ darstellt. Dieses zeigt sich bereits klinisch in der längeren Überlebenszeit von Lebertransplantaten im Vergleich zu anderen transplantierten Organen.

Weiter zeigt sich bei kombinierter Lebertransplantation (z.B. Leber und Niere), dass die Leber offensichtlich Eigenschaften besitzt, andere transplantierte Organe gegen eine Abstoßung zu schützen. Dieser Effekt wurde u.a bei Haut-, Herz-, und Pankreastransplantation mit simultaner Lebertransplantation beobachtet (59,78).

Die Ursachen liegen vermutlich in einem spezifischen Verlust zellulärer Immunreaktionen und dem Fehlen bestimmter Gewebsantigene in der Leber (49).

In der Leber werden u.a. Prostaglandine,  $\alpha$ -1-,  $\beta$ -2-Makroglobuline und eine Vielzahl an Akute-Phase-Proteinen mit einer toxischen Wirkung auf T-Zellen produziert.

Weiter ist die Leber ein Organ mit großem Regenerationspotenzial und ein bevorzugter Ort für Apoptose von T-Zellen und aus diesem Grund möglicherweise ein zentrales Organ bei einer Toleranzinduktion (5).

#### **6.4 Effizienz der Blockade costimulatorischer Signale und der Vorbehandlung mit adoptivem Zelltransfer**

Für die Untersuchung der immunologischen Prozesse einer Abstoßung sind unterschiedliche Tiermodelle bekannt. Die mittlerweile etablierten mikrochirurgischen Techniken bei Lebertransplantationen an Ratten eröffnen einen weiteren Weg, die wesentlichen Fragen einer Toleranzinduktion und speziell Effizienz neuer Therapieansätze wie einer CTLA-4Ig Gabe kombiniert mit einem adoptiven Zellinfusion unter definierten Bedingungen abzuklären (49,83).

Wie bereits vor 30 Jahren von Zimmermann beschrieben, kommt es bei der Kombination von DA Ratten als Spender auf LEW Ratten als Empfänger nach Lebertransplantation infolge der großen Unterschiede im HLA System zu einer heftigen Abstoßungsreaktion. Deswegen war diese Stammkombination aus unserer Sicht besonders gut geeignet, um die Effizienz dieser Behandlung auf die Akzeptanz eines Transplantates zu testen.

##### **6.4.1 CTLA-4Ig**

CTLA-4-Ig ist ein Fusionsprotein der Immunglobulin-Superfamilie, das aus einem weiteren CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4)-Teil und einem Antikörperanteil IgG1 besteht. CTLA-4Ig besitzt die Fähigkeit eine sog. Anergie zu induzieren (21,43), eine Erhöhung der Th(2)-Zytokine zu verursachen (3,4) und/oder Apoptose zu beeinflussen (41), indem es an den B7-Rezeptor der antigen-präsentierenden Zelle (APC) bindet, das CD28/B7-Signal (Co-Stimulation) während

der Abstoßungsreaktion blockiert und dadurch die weitere T-Zellen-Aktivierung unterbricht (3, 54).

Auf Grund dieser Effekte wird die Blockade der CD28/B7-Interaktion (Co-Stimulation) als eine vielversprechende Möglichkeit zur Immunsuppression beschrieben (43).

In unserer Untersuchung zeigte sich nach Gabe von CTLA-4Ig regelhaft eine deutlich supprimierte CD25-Expression und deutlich mehr PARP-Produkte als Zeichen einer Apoptose im (Transplantat-)Gewebe. Weiter zeigten beiden mit CTLA-4Ig behandelten Gruppen (3 und 4) eine verlängerte Überlebenszeit über 150 Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe (medianes Überleben 10 Tage) und der nur mit Spenderzellen behandelten Gruppe 2 (medianes Überleben 18 Tage).

Für die Leber gibt es zwar bisher keine klinische Studie, allerdings gibt es aktuell bereits eine erfolgreiche Langzeitstudie, die einen möglichen Vorteil der Anwendung von CTLA-4Ig (Handelsname Belatacept) in einem Calcineurin Inhibitor freien Protokoll nach Nierentransplantation gegenüber dem Standardprotokoll mit Cyclosporin belegt (76).

Hier zeigte sich, dass es unter Anwendung von Belatacept zwar zu einer Zunahme akuter Abstoßungen und einer erhöhten Inzidenz lymphoproliferativer Erkrankungen kommen kann, aber es zeigte sich auch in derselben Gruppe, dass eine niedrigere Inzidenz der Nebenwirkungen – Hyperlipidemie, Hypertonie auftrat. Außerdem ist vor allem im Langzeitverlauf die Nierenfunktion besser im Vergleich zur herkömmlichen Cyclosporin-basierten Immunsuppression (76).

	<b>Expression</b>	<b>Funktion und Signale</b>
<b>CD28</b>	CD4(+)-,CD8(+)- T-Zellen	Co-stimulation CD28/B7Interaktion→IL-Produktion
<b>CTLA-4</b>	CD4(+)-,CD8(+)-T-Zellen	CTLA4/B7Interaktion→ Adhäsionsaffinität T-Zellen und APC
<b>B7</b>	B-Zellen, Makrophagen, DCs	Co-stimulation CD28/B7Interaktion→IL-Produktion

**Tabelle 22.** CD28, B7, CTLA4- Expression, Funktion und Rolle für die Signaltransduktion (modifiziert nach Linsley und Ledbetter (43))

#### **6.4.2 Chimärismus**

Mit dem Begriff Chimärismus bezeichnet man einen Zustand, bei dem spenderspezifische Zellen im peripheren Blut oder Gewebe des Organempfängers nachweisbar sind. Dieses Phänomen wurde in der Transplantationsmedizin erstmals von Starzl et al. beschrieben (69). Nach Starzl (70) gibt es eine feste Korrelation zwischen dem Phänomen Chimärismus und einer Transplantationstoleranz, was letztendlich im Einklang mit unserem Ergebnis wäre. In den Gruppen 3 und 4, die eine verlängerte Überlebenszeit und die Entwicklung von Toleranz gegenüber dem Transplantat zeigten, konnten wir Chimärismus nachweisen.

Dagegen zeigte sich in den beiden anderen Gruppen (unbehandelte Kontrollgruppe und nur Spenderzell-behandelte Gruppe) kein Nachweis von Chimärismus, was mit einer entsprechend kurzen Überlebenszeit als Folge der Entwicklung einer Abstoßungsreaktion einherging.

Bereits Pichlmayr, Hisanaga und Delis et al (12, 23, 58) konnten zeigen, dass das Vorhandensein von Spenderzellen eine leichte Immunreaktion induziert, was eine bessere Langzeitprognose nach Lebertransplantation induziert. In weiteren experimentellen Studien konnte festgestellt werden, dass spendergenerierte Zellen eine kritische Rolle für die Akzeptanz eines Transplantats spielen und zu einer Toleranzentwicklung ohne Anwendung einer dauerhaften Immunsuppression beitragen können (66).

Ein solcher adoptiver Zelltransfer kann unter experimentellen Bedingungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Bezug zur Transplantation durchgeführt werden. Allerdings beschreiben die meisten Studien den Zeitpunkt eine Woche vor Transplantation als optimal, weshalb in unserer Studie ebenfalls dieser Zeitpunkt gewählt wurde. Aufbereitete Spender-Milzzellen wurden am 7. und 2.Tag vor Transplantation appliziert. CTLA-4Ig wurde in den entsprechenden Gruppen an Tagen 8,7, 3 und 2 vor Transplantation verabreicht.

Ziel des vorzeitigen adoptiven Zelltransfers war es, einen zusätzlichen positiven Einfluss auf die Transplantatsverträglichkeit und die Protektion des Transplantats vor einer Schädigung durch alloreaktive T-Zellen zu erreichen (45, 51, 84). Frühere Experimente mit einer kombinierten Anwendung von CTLA-4Ig und Spenderzellen begründeten die Hypothese, dass beide zur Transplantattoleranz beitragen können (78, 79). Beide Maßnahmen scheinen auf unterschiedliche Weise eine Apoptose von

aktivierten T-Zellen zu induzieren (78, 79). Unsere Ergebnisse zeigen zwar nur eine Verlängerung der Überlebenszeit und Transplantatsakzeptanz unter der Anwendung von CTLA-4Ig, allerdings ergibt sich ebenfalls eine Verbesserung dieses Effekts durch adoptiven Zelltransfer, wohingegen die Effekte einer alleinigen Zellgabe nicht ausreichen, um eine suffiziente Transplantatkontrolle zu erreichen.

Mechanismus der potenzierten gemeinsamen Wirkung liegt möglicherweise in einer vermehrten Expression der costimulatorischen Moleküle durch das Vorhandensein spendergenerierter Zellen, deren Interaktion später durch die Applikation des CTLA-4Igs unterbrochen wird (43). Weil die Effekte des CTLA-4Ig ca. 48–72 Stunden nach Applikation auftreten (43), ist der beste Zeitpunkt einer Gabe spenderabgeleiteter Zellen vor oder kurz nach der CTLA4-Ig Gabe in der so genannten Induktionsphase der Transplantatakzeptanz (30).

## **6.5 Charakterisierung der Effizienz einer Vorbehandlung mit CTLA-4Ig und spenderabgeleiteten Zellen anhand von Histologie, Überlebenszeit, CD25-Expression, Apoptose und Chimärismus**

### **6.5.1 Überlebenszeit und Histologie**

Nach der Klassifikation von Zimmermann und Davies (83) entwickelt sich nach tierexperimenteller Transplantation im Rattenmodell mit der Stammkombination DA auf LEW in den ersten 11 Tagen eine starke Abstoßungsreaktion.

In Ausnahmefällen wurde aber auch von mehreren Autoren bei der gleichen Stammkombination eine Spontan toleranz (Organakzeptanz ohne Immunsuppression) beobachtet (14, 29, 63, 83).

In unserer Studie betrug die Überlebenszeit in der Kontrollgruppe 10 Tage, in Gruppe 2 (vorbehandelte Tiere mit spenderspezifischen DA-Zellen) 18 Tage und in Gruppe 3 (vorbehandelte Tiere mit CTLA-4Ig) 150 Tage, woran sich bereits zeigte, dass sowohl die alleinige Vorbehandlung mit Spenderzellen als auch die alleinige Vorbehandlung mit dem Antikörper einen modulierenden Einfluss auf die Abstoßungsreaktion hatten. Einige Tiere dieser drei Gruppen starben aber auch vorzeitig infolge der starken Abstoßungsreaktion und daraus resultierender Leberinsuffizienz, Splenomegalie und/oder gastrointestinale Blutungen.

Alle Tiere der Gruppe 4, die DA-Splenozyten und CTLA-4Ig als Vorbehandlung erhalten hatten, hatten eine signifikant längere Überlebenszeit von mehr als 150 Tagen. Die Ergebnisse aus Gruppe 3 und 4 deuten darauf hin, dass die CTLA-4Ig-

Anwendung den größeren Einfluss auf die Transplantatüberlebenszeit hat (43,56), wobei der adoptive Zelltransfer der spenderabgeleiteten Zellen eine weitere bessere Transplantatsakzeptanz bedingt (70).

Die Daten der histologischen Befunde, die der sensitivste Parameter nach Transplantation sind (14), zeigten am Tag 6 in nahezu allen Tieren aller Gruppen ein starkes periportales Infiltrat. Im Verlauf bildet sich dieses entweder nach der zweiten Woche zurück oder es kam zu einer schweren Abstoßung dritten Grades, die in den Gruppen 1 und 2, regelhaft eintrat. Dieser Prozess wurde mikroskopisch durch Nekrosen, Gallenwegsobstruktionen, Infiltrationen der Sinusoide und Portalfelder charakterisiert.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Langzeittieren der Gruppen 3 und 4 eine spontane Resorption des Infiltrates. In Gruppe 3 zeigten die Tiere Gallenwegsproliferationen und mononukleare Infiltrate typisch für chronisch-immunologische Veränderungen. Die Leberhistologie der Gruppe 4 zeigte am 12. postoperativen Tag und bei den Langzeittieren (Tag 150) ein unauffälliges Lebergewebe, was auf einen synergistischen Effekt von CTLA-4Ig und Spenderzellen hinweist.

### **6.5.2 Interleukin-2**

Eine IL-2-Sekretion repräsentiert ein kritisches Signal in der Reaktion des Immunsystems, und stellt ein wichtiges Zytokin im Rahmen der Abstoßungsreaktion dar, welches das Wachstum, die Differenzierung und die Proliferation von T-Zellen initiiert (17, 44, 64).

Von drei unterschiedlichen bekannten IL-2-Rezeptor-Subunits (IL-2R-alpha-CD25, IL-2R-beta CD122 und IL-2R gamma-CD132) ist CD25 ein Marker der T-Zell-Aktivierung und kann daher als diagnostischer und prognostischer Parameter der akuten Rejektion nach Transplantation dienen (2). Aus diesem Grund wurde in dem durchgeführten Experiment dessen Expression in der Leber und der Milz untersucht. Am Tag 6 und Tag 12 nach Transplantation wurde bei der Kontrollgruppe und der Gruppe 2 (ohne CTLA-4Ig-Vorbehandlung) ein globales Infiltrat mit CD25-positiven Zellen in der Leber und der Milz gefunden. Im Gegensatz dazu führte die CTLA-4Ig-Vorbehandlung in Gruppen 3 und 4 zur Reduktion der CD25-Expression zu allen Zeitpunkten in beiden Organen.

Der Status der Hyporeaktivität mit fehlender IL-2-Sekretion von T-Zellen wird in der Literatur als Anergie beschrieben (24). Anergie und Apoptose wurden von vielen Autoren als ein Mechanismus der Toleranz bezeichnet (81). IL-2 wird in den letzten Jahren auch als Cofaktor bei der Entwicklung von Apoptose in T-Zellen diskutiert. Nach einigen Autoren ist IL-2 ein Apoptose-Initiator oder Primer (42), weil er gleichzeitig die Sensitivität der T-Zellen erhöht (5), andere denken, dass IL-2 die T-Zellen vor Apoptose schützt und diese inhibiert (59).

### **6.5.3 Apoptose**

Als Apoptose bezeichnet man einen programmierten Zelltod (33, 34). Sie ist ein fundamentaler biologischer Prozess in der Embryo- und Morphogenese, der auch für die T-Zellhomöostase notwendig ist (26, 46), und damit als ein Weg der zentralen und peripheren Toleranzentwicklung beschrieben wird (81).

Es sind zwei Formen der Apoptose beschrieben worden: AICD (activation induced cell death) und PACD (passiv cell death). Nur AICD spielt, durch die Elimination der alloreaktiven T-Zellen, eine Rolle in der Toleranzentwicklung. Sie ist Fas-abhängig, wird durch Proteine der Bcl-Familie verhindert und durch IL-2 induziert, wie schon in der Einleitung dieser Arbeit erklärt wurde (89).

Apoptose verläuft in drei Stadien: der Initiationsphase, der Effektorphase der Kernveränderungen und endet mit der Degradation und Segmentation der DNA-Fragmente (61). Seit der ersten Beschreibung der Apoptose von Kerr (33) bis heute sind die Degradationsprodukte der DNA das wichtigste biochemische Korrelat dieses Prozesses. Aus diesem Grund analysierten wir das Vorliegen von sog. PARP-Produkten, die in Folge von Degradation und Segmentation der DNA entstehen. PARP sind Nuklear-Zink-Finger-DNA-verbundene Proteine, die als zuverlässiger Apoptosenachweis anerkannt sind (61).

PARP-Fragmente wurden in der Leber untersucht, da hier T-Zellen im Rahmen der Allograft-Reaktion in großen Mengen vorhanden sind und Ihre Aktivierung und spätere Elimination durch Apoptose die Entwicklung von Toleranz bestimmen soll (5, 14).

PARP Produkte waren in der Gruppe 1 nicht nachweisbar und in Gruppe 2 nur am Tag 12 schwach zu identifizieren. Im Gegensatz dazu waren PARP Fragmente in den Gruppe 3 und 4 sowohl am Tag 6 als auch 12 deutlich nachweisbar.

Nach experimentellen Ergebnissen von Sun et al. (74, 75) ist die spontane Akzeptanz einer Transplantatleber mit dem Vorhandensein einer großen Menge von apoptotischen T-Zellen im Portalfeld verbunden. Eine andere Studie hat gezeigt, dass die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen mit einer Akkumulation letzterer in der Leber korreliert und später dort zu Apoptose führt (14), was auch die Ergebnisse unserer Arbeit erklären würde.

Nach Koglin et al. (31) ist Apoptose von T-Zellen während der Abstoßung ein sehr aktiv und intensiv ablaufender Prozess innerhalb des Transplantats.

Nach anderen Autoren gibt es immer eine kleine Menge apoptotischer Zellen im Gewebe, diese sind zumeist inflammatorische selten parenchymatöse Zellen (35, 61).

Vermutlich ist die Menge der apoptotischen Zellen im Transplantat von der Zeit der Untersuchungen nach Transplantation abhängig. Als Untersuchungszeitpunkte unserer Studie wurden empirisch die Tage 6 und Tag 12 nach Transplantation gewählt und für Spätergebnisse falls vorhanden auch Langzeittiere verwendet.

Bei Versuchen an Ratten in der DA auf LEW-Stammkombination wurde Apoptose an den Tagen 1, 2, 3, 4 und 7 nach Transplantation festgestellt und es wurden insbesondere T-Zellen angegriffen (35).

Nach einigen Autoren (5, 14, 55) führte eine nach 14 Tagen am stärksten ausgeprägte Apoptose zur Deletion insbesondere der T-Zellen, die das Transplantat infiltriert hatten.

Am Tag 6 und Tag 12 nach ORLT waren in unserer Studie die PARP-Produkte der Apoptose in der Gruppe 4 (Vorbehandlung DA-Zellen und CTLA-4Ig) am deutlichsten ausgeprägt. Die Tiere von Gruppe 4 zeigten auch die längste Überlebenszeit und beste Akzeptanz des Transplantats. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Akzeptanz eines Transplantats mit einer höheren Rate von Apoptose in den ersten 1–2 Wochen nach Transplantation korreliert (5,14).

Im Vergleich dazu waren in der Kontrollgruppe Apoptosen nur am Tag 6 nach der Transplantation schwach ausgeprägt und in der Gruppe 2 (DA-Zellen-Vorbehandlung) nur am zwölften Tag zeitgleich mit einer meist fortgeschrittenen Abstoßung.

#### **6.5.4 Chimärismus**

Das Vorhandensein der spenderabgeleiteten Zellen im Empfänger wurde in einigen experimentellen Modellen als ein erster Schritt in der Toleranzinduktion angesehen (71).

Die übertragenen Zellpopulationen migrieren ins Empfängerlymphgewebe und rufen die Aktivierung, Differenzierung, Deletion und Erschöpfung der alloreaktiven T-Zellen hervor (6, 65, 74, 75). Es wird vermutet, dass die Spenderzellakkumulation im Empfängergewebe eine Hyporeaktivität verursacht. Nach einigen Autoren (14,51) ist diese Hyporeaktivität des Empfängers von der Lokalisation der spenderabgeleiteten übertragenen Zellen abhängig. Nach Dresske et al. (14) wurde nur bei dem gleichzeitigen Vorhandensein von Chimärismus in der Milz des Empfängers eine spontane Akzeptanz bei Rattenlebertransplantationen beobachtet.

Entsprechend dieser Studie wurden in unserem Versuchsplan die Milzpräparate hinsichtlich Chimärismus untersucht. Am Tag 6 war erstaunlicherweise in allen Gruppen eine Proteinexpression spenderabgeleiteter Zellen vorhanden.

Eine ausgeprägte DA-spezifische Anfärbung wurde im Milzgewebe am Tag 12 in der Gruppe 4 dargestellt und eine schwache Expression der gleichen Anfärbung in der Kontrollgruppe sowie den Gruppen 2 und 3 beobachtet. Allerdings hätte man erwarten können, dass in der Gruppe 2 mit Splenozyten-Transfer höhere Raten an DA-Zellen nachzuweisen sind. Wahrscheinlich rufen die spendergenerierten Zellen und das übertragene lösliche MHC-I eine klonale Erschöpfung der T-Zellen hervor – eine schnelle Reaktion zwischen alloreaktiven T-Zellen und übertragenen DA-Zellen, die keine spezifische DA-Anfärbung in der Milz am Tag 12 bedingt (11, 68).

Andererseits deuten die ausgeprägten DA-spezifischen Anfärbungen in Gruppe 3 und 4 am Tag 6 und Tag 12, die eine gute Verträglichkeit zum Transplantat zeigen, darauf hin, dass das Vorhandensein des Phänomens Chimärismus ein Marker für die Akzeptanz des Transplantats und/oder der Entwicklung von Toleranz sein könnte.

Schlußfolgernd kann man zusammenfassen: Die Untersuchungen zur CD25-Expression, Apoptose und Chimärismus nach der einzelnen oder kombinierten Vorbehandlung mit CTLA-4Ig und spenderabgeleiteten Zellen in unserer Studie hat gezeigt, dass CTLA-4Ig eine immunsuppressive Wirkung hat und zur Reduktion einer CD25-Expression und höheren Apoptoserate führt.

Dies kann zum einen an der Fähigkeit des CTLA-4Ig, eine Anergie zu induzieren und damit eine Erhöhung der Th(2)-Zytokine zu vermitteln, liegen (3, 4) oder ist mit einem

vermehrten Auftreten von CD4+CD25+T-Zellen assoziiert (21, 22) und/oder erfolgt über eine Beeinflussung von Apoptose (81).

Trotzdem war der Verlauf der Empfänger in Gruppe 4 nach Transplantation durch einen zusätzlichen adoptiven Zelltransfer deutlich günstiger, weshalb wir annehmen, dass beide Vorbehandlungen eine synergistische Wirkung haben. Aufgrund der Komplexität der Mechanismen und unseren eingeschränkten Untersuchungsmöglichkeiten, konnte die Frage zum genauen Mechanismus und optimalen Zeitpunkt einer Applikation der Zellen in Bezug auf die Durchführung der Transplantation nicht abschließend geklärt werden.

## **7. Zusammenfassung**

*Die Induktion einer Transplantatakzeptanz ohne dauerhafte Immunsuppression ist das Ziel der aktuellen Forschung auf dem Gebiet der Toleranzinduktion.*

*In dieser Arbeit wird anhand der experimentellen Lebertransplantation im Rattenmodell (DA auf LEW) die Effizienz einer Vorbehandlung mit CTLA-4Ig und Spenderzellen hinsichtlich einer solchen Toleranzmodulation untersucht.*

*Das Experiment schließt drei Gruppen mit vorbehandelten Tieren ein. Zum Vergleich diente eine Kontrollgruppe von Tieren die ohne Vorbehandlung transplantiert wurde.*

*Drei Tiere pro Gruppe wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu genauer Beurteilung einer pathologischen und immunologischen Abstoßungsreaktion getötet.*

*Die Kriterien zur Evaluation der akuten Reaktion waren Überlebenszeit, histopathologisches Bild, laborbiochemische Untersuchungen und die immunologische Aufarbeitung.*

*Die Überlebenszeit der Tiere der Kontrollgruppe bzw. der Gruppe 2 (Vorbehandlung mit DA-Zellen), Gruppe 3 (Vorbehandlung mit CTLA-4Ig) und Gruppe 4 (Vorbehandlung mit CTLA-4Ig und DA-Zellen) betrug im Median jeweils 10, 18, 150 und über 150 Tage.*

*Tiere aller Gruppen zeigten am sechsten postoperativen Tag ein starkes periportales Infiltrat, das später in der Gruppe 1 und 2 zur Entwicklung einer Abstoßungsreaktion dritten Grades führte. Die Leberpräparate der Gruppe 3 zeigten Zeichen für chronische immunologische Veränderungen. In Gruppe 4 wurde ein unauffälliges Lebergewebe beobachtet. Für die weitere Beurteilung der Transplantatakzeptanz wurde die Apoptoserate anhand von PARP-Produkten und apoptotischen Zellkernen untersucht.*

*Am deutlichsten ausgeprägt war ein apoptotischer Zelltod in der Gruppe 4 und zwar zu allen Untersuchungszeitpunkten.*

*In der Kontrollgruppe war eine Apoptose nur am Tag 12 nach Transplantation erkennbar. In Gruppe 2 (DA-Zellen-Vorbehandlung) zeigte sich diese nur am 12. Tag im Rahmen einer fortgeschrittenen Abstoßung und ebenso bei Langzeittieren. Apoptose war bei Langzeit-überlebenden Tiere selten nachweisbar. Die Ergebnisse der in-situ-Apoptose-Detektion entsprechen denen des Western Blots.*

*Als weiterer immunologischer Parameter wurde die Expression von IL-2R untersucht. Am Tag 6 und Tag 12 nach Transplantation wurde sowohl bei der Kontrollgruppe als*

*auch in der Gruppe 2 (ohne CTLA-4Ig-Vorbehandlung) ein globales Infiltrat mit CD25-positiven Zellen in der Leber und der Milz festgestellt.*

*In den Gruppen mit der CTLA-4Ig-Vorbehandlung (Gruppen 3 und 4) wurde dagegen eine Reduktion der CD25-Expression zu allen Zeitpunkten der Untersuchungen gesehen.*

*Die kombinierte Vorbehandlung mit CTLA-4Ig und DA-Zelle führte schließlich zu einer kompletten Suppression der IL-2 R-Expression. Lediglich bei den Langzeittiere fanden sich vereinzelt CD25-positive Zellen im Leber- und Milzparenchym.*

*Weiterhin wurde in dieser Studie die Milz der Empfängertiere auf spenderspezifisches MHC-I hin untersucht. In der Kontrollgruppe und in der Gruppe 2 konnten spenderspezifische Zellen nur schwach nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu waren diese in den Gruppen 3 und 4 stärker ausgeprägt.*

*Zusammengefasst zeigte sich, dass eine alleinige Vorbehandlung mit DA-Zellen die Dauer der Überlebenszeit und die Transplantatverträglichkeit des Empfängers nicht verbessern kann.*

*Dahingegen führt die Vorbehandlung mit CTLA-4Ig zur Verlängerung der Überlebenszeit, zur Verminderung der CD25R-Expression und zur Reduktion der Abwehrprozesse. Allerdings zeigten sich auch hier bei den langfristig überlebenden Tieren in der Histologie Schäden, die mit einer chronischen Abstoßung vergleichbar sind.*

*Erst die Kombination von CTLA-4Ig mit spenderabgeleiteten Zellen führte in unserem Experiment zu einer langfristigen Verbesserung des Überlebens und der Transplantatsakzeptanz bei Ratten, was sich durch einen Rückgang immunologischer Begleitreaktionen belegen ließ.*

*Die Immunmodulation mittels Zelltransfer und Antikörperinduktion stellt somit ein vielversprechendes Konzept zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion nach Lebertransplantation dar. Perspektivisch sollte dieses Konzept in klinischen Studien weiter evaluiert werden, da natürlich die Ergebnisse tierexperimenteller Studien aufgrund vieler Unterschiede zum Menschen nur eingeschränkt übertragbar sind.*

## 8. Abkürzungsverzeichnis

<b>APC</b>	Antigen präsentierende Zelle
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>DA</b>	Dark Agouti (Rattenstamm)
<b>H.E.</b>	Hämatoxilin-Eosin Färbung
<b>HLA</b>	Human Leucocyte Antigen
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL-2</b>	Interleukin 2
<b>IL-4</b>	Interleukin 4
<b>IL-5</b>	Interleukin 5
<b>IL-6</b>	Interleukin 6
<b>IL-10</b>	Interleukin 10
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>mAk</b>	monoklonale Antikörper
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex (Haupt-Histokompatibilitätskomplex)
<b>NK</b>	natürliche Killerzellen
<b>OLT</b>	orthotope Lebertransplantation
<b>ORLT</b>	orthotope Rattenlebertransplantation
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>POD</b>	postoperativer Tag
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>TBE</b>	Tris-Borat-Puffer
<b>TCR</b>	T-Zell-Rezeptor
<b>TH1</b>	T-Helfer-T-Zelle

## 9. Literatur

1. Basic Immunology. Abbas, Lichtmann, Verlag Elsevier. 2004
2. Adams DH, Karnovsky MJ. Hypercholesterolemia does not exacerbate arterial intimal thickening in chronically rejecting rat cardiac allografts. *Transplant Proc.* 1989, Feb; 21:437-9.
3. Arima T, Goss A, Walp LA, Fley MW. Administration of anti-CD4 monoclonal antibody with intrathymic injection of alloantigen results in rat cardiac allograft tolerance. *Surgery.* 1995, Aug;118(2):265-72;
4. Arima T, Lehmann M, Flye MW. Induction of donor specific transplantation tolerance to cardiac allografts following treatment with non-depleting (RIB 5/2) or depleting (OX-38) anti-CD4 mAb plus intrathymic or intravenous donor alloantigen. *Transplantation.* 1997, Jan 27;63(2):284-92
5. Bertolino P, McCaughan GW, Bowen DG. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the "liver tolerance effect". *Immunology and Cell Biology.* 2002, 80:84-92
6. Bishop GA, Sun J, Sheil AGR, McCaughan GW. High-dose/activation – associated tolerance: a mechanism for allograft tolerance. *Transplantation.* 1997, 64(10):1377-1382
7. Bolton EM, Bradley JA. Co-stimulatory blockade - a pathway to tolerance? *Am J Transplant.* 2006, May;6:857-8
8. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Henderson RG, Aziz S, Lewis P. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases and 2 livers. *Lancet.* 1979 Nov 17;2(8151): 1033-6.
9. Chandraker A, Russel ME, Glysing-Jensen T, Willett TA, Sayegh MH. T-cell costimulatory blockade in experimental chronic cardiac allograft rejection, effects of Cyclosporine and Donor Antigen. *Transplantation.* 1997, 63(8) :1053-1058
10. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signalling pathway. *Apoptosis.* 2002, 7(4):313-319
11. Davies HS, Pollard S et al. Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients. *Transplantation.* 1989, 47(3):524-27
12. Delis S, Ciancio G, Burke GW, Garsia-Morales R, Miller J. Donor bone marrow transplantation chimerism and tolerance. *Transplant Immunology.* 2004, 13: 105-115
13. Demirci G, Gao W, Zheng X X, Malek T R, Strom T B , Li X C. On CD28/CD40 Ligand costimulation common gamma-chain signals and the alloimmune response. *J Immunol.* 2002, 168:4382-4390

14. Dresske B, Lin X, Huang D-S, Zhong X, Fändrich F. Spontaneous tolerance: experience with the rat liver transplant model. *Human Immunol.* 2002, 63:19-21
15. Dringenberg U. Organstransplantation. Ein praktischer Leitfaden für Operationspersonal. Verlag Hans Huber. 1995
16. Gallon L, Chandraker A, Issazadeh S, Peach R, Linsley P S, Turka LA, Sayegh MH, Khoury SJ. Differential effects of B7-1 blockade in the rat experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J. Immunol.* 1997, 159:4212-4216
17. Gassel H-J, Otto C, Gassel AM, Mayer D, Steger U, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. Tolerance of rat liver allografts induced by short-term selective immunosuppression combining monoclonal antibodies directed against CD25 and CD154 with subtherapeutic Cyclosporine. *Transplantation* 2002, 69:1058-1067
18. Goddard S, Adams DH. New approaches to immunosuppression in liver transplantation. *J Gastroenterology and Hepatology.* 2002, 17:116-126
19. Graser E, Risch K, Linsley P S, Hancock W, Müller A, Brock J, Reinke P, Kupiec-Weglinski JW, Volk H D, Lehmann M. Synergism of CTLA-4Ig and anti-CD4 monoclonal antibody treatment in a rat kidney transplant model. *Transplant Proc.* 1997, 29:1307-1309
20. Guillot C, Mathieu P, Coathalem H, Le Mauff B, Castro M, Tesson L, Usal C, Laumonier T, Brouard S, Soullillou JP, Lowenstein PR, Cuturi MC, Anegon I. Tolerance to Cardiac Allografts Via Local and Systemic Mechanisms After Adenovirus-Mediated CTLA4Ig Expression. *J Immunol.* 2000, 164: 5258-5268
21. Guo L, Li Y, Enosawa S, Harihara Y, Funeshima N, Kimura H, Fujino M, Makuuchi M, Suzuki S. Prolongation of liver xenograft survival by adenovirus vector-mediated CTLA-4Ig gene transfer. *Transplant Immunology.* 2003, 11: 155-162
22. Guo L, Fujino M, Kimura H, Funeshima N, Kitazawa Y, Harihara Y, Tezuka K, Makuuchi M, Suzuki S, , Li Y. Simultaneous blockade of co-stimulatory signals, CD28 and ICOS induced a stable tolerance in rat heart transplantation. *Transplant Immunology.* 2003, 12: 41-48
23. Hisanaga M, Schlitt HJ, Hundrieser J, Wonigeit K, Nakajima Y, Kanehiro H, Nakano H, Pichlmayr R. Frequency and clinical correlations of allogeneic microchimerism after heart, liver, and lung transplantation. *Transplant Proc.* 1997, Feb-Mar;29(1-2):1215-7.
24. Holländer GA, Zuklys S, Förster E, Krenger W. On costimulatory signals and T cell tolerance: relevance for transplantation immunity. *Transplant Proc.* 1998, 31:25-3
25. Homann M. Standardvorgehen für die orthotope Lebertransplantation. *Ärztblatt Thüringen* 11/2006, S. 523-525

26. Honey K, Cobbold SP, Waldmann H. Dominant tolerance and linked suppression induced by therapeutic antibodies do not depend on Fas-FasL interaction. *Transplantation*. 2000, 69(8):1683-1689
27. Kerr JF, Wyllie AH. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Currie AR.Br J Cancer*. 1972, Aug; 26(4):239-57.
28. Kishimoto K, Sandner S, Imitola J, Sho M, Li Y, Langmuir PB, Rothstein DM, Strom TB, Turka LA, Sayegh MH. Th1 cytokines, programmed cell death, and alloreactive T cell clone size in transplant tolerance. *J Clin Invest*. 2002, 109:1471-1479
29. Knoop M, Neumann U, Langrehr JM, Lang M, Neuhaus P. Impact of donor factors on postoperative liver function after orthotopic rat liver transplantation. *Transplant Proc*. 1998, 30:2331-2333
30. Ko S, Deiwick A, Jager MD, Dinkel A, Rohde F, Fischer R, Tsui TY, Rittmann KL, Wonigeit K, Schlitt HJ. The functional relevance of passenger leukocytes and microchimerism for heart allograft acceptance. *Nat Med*. 1999, Nov; 5(11):1292-7.
31. Koglin J und Russel ME. Alloimmune-mediated apoptosis: comparison in mouse models of acute and chronic cardiac rejection. *Transplantation*. 1999, Mar 27;67(6):904-9
32. Konertz W. Heart transplantation in rats. *Transplant Proc*, 1980: 11(1):593
33. Kerr JF, Wyllie AH. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Currie AR.Br J Cancer*. 1972, Aug; 26(4):239-57.
34. Krammer PH. Apoptose. *Deutsche Ärzteblatt*. 2000, 97:A-1752-1759, Heft 25
35. Krams SM, Egawa H, Quinn MB, Villanueva JC, Garcia-Kennedy R, Martinez OM. Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection. *Transplantation*. 1995, Feb 27; 59(4): 621-5.
36. Kriesel D, Petrowsky H, Krasinskas AM, Krupnick AS, Szeto WY, McLean AD, Popma SH, Gelman AE, Traum MK, Furth EE, Moore JS, Rosengard BR. The role of passenger leukocyte genotype in rejection and acceptance of rat liver allografts. *Transplantation*. 2002, 73:1501-1507
37. Langrehr JM, Glanemann M, Schneller A, Neumann U, Guckelberger O, Lohmann R, Klupp J, Jonas S, Knoop M, Lobeck H, Schlag H, Keck H, Settmacher U, Bechstein WO, Neuhaus PJ. A randomized trial comparing anti – Interleukin-2 receptor antibody and placebo for immunosuppressive therapy after OLT. *Transplant Proc*. 1998, 30:1445-1446
38. Langrehr JM, Schneller A, Guckelberger O, Lohmann R, Neumann U, Jonas S, Klupp J, Settmacher U, Knoop M, Bechstein WO, Neuhaus PJ. Comparison of

- quadruple induction including ATG or IL-2R antibody with FK506-based therapy after liver transplantation. *Transplant Proc.* 1998, 30:1439-1440
39. Lee S, Charters AC. A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 1973, 16(6): 664-9
  40. Li W, Lu L, Wang Z, Wang L, Fung JJ, Thomson AW, Qian S. Costimulation blockade promotes the apoptotic death of graft –infiltrating T-cells and prolongs survival of hepatic allografts from FLT-3L treated donors. *Transplantation,* 2001: 72(8):1423-1432
  41. Li W, Zheng X, Kuhr CS, Perkins JD. CTLA-4Ig engagement is required for induction of murine liver transplant spontaneous tolerance. *Am J Transplant.* 2005, 5:978-86
  42. Li Y, Li XC, Zheng X, Wells A, Turka L A, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med.* 1999, 5(11):1298-1302
  43. Linsley PS und Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Ann Rev Immunol.* 1993, 11:191-212
  44. Malek TR. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J Leukoc Biology.* 2003, 12:74(6):961-5.
  45. Mathew JM, Shenoy S, Phelan D, Lowell J, Howard T, Mohanakumar T. Biochemical and immunological evaluation of donor specific soluble HLA in the circulation of liver transplant recipients. *Transplantation.* 1996, 62(2): 217
  46. Morelli AE. The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: its impact on transplantation. *Am J Transplant.* 2006, 6:254-61
  47. Müller P. Heart transplantation model as an immunological monitor. *Microsurgery.* 1990, 11:122-126
  48. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997, 88:355-365
  49. Neuhaus P. *Organspende Organtransplantation. Ein Report des Machbaren* Herausgeber E. Dietrich. Verlag Schulz. 1985, Seite 243-270
  50. Nickerson P, Steiger J, Zheng XX, Steele AW, Steurer W, Roy-Chaudhury P, Strom TB. Manipulation of cytokine networks in transplantation: false hope or realistic opportunity for tolerance? *Transplantation.* 1997, Feb 27;63(4):489-94.
  51. Okuda T, Ishikawa T, Azhipa O, Ichikawa N, Demetris AJ, Starzl TE, Murase N. Early passenger leukocyte migration and acute immune reactions in the rat recipient spleen during liver engraftment: with particular emphasis on donor major histocompatibility complex class II+ cells. *Transplantation.* 2002, 74:103-111

52. Garsia-Olmo DS, Ontanon J, Atienzar A, Garsia-Rivas M. Absence of a relationship between the increased survival of skin grafts provoked by additional spleen transplantation and the detection of donor chimeric cells in rats. *Eur Surg Res.* 2003, 35:425-29
53. Orloff SL, Hirose R, Lin Z, Narumi S, Stock PG, Ascher NL. Clonal deletion is one mechanism responsible for tolerance in mixed hematopoietic chimeras. *Transplant Proc.* 1999, Feb-Mar; 29(1-2):1198-200.
54. Ostrov DA, Shi W, Schwartz J-CD, Almo SC, Nathenson SG. Structure of murine CTLA-4 and its role in modulating T-cell responsiveness. *Science.* 2000, 290:816-819
55. Parijs LV, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity.* 1996, 4:321-328
56. Pearson TC, Alexander DZ, Corbascio M, Hendrix R, Ritchie AC, Linsley PS, Faherty D, Larsen CP. Analysis of the B7 costimulatory pathway in allograft rejection. *Transplantation.* 1997, 63(10):1463-1469
57. Pichlmayr R. *Transplantationschirurgie*, Springer Verlag 1981, Seite 726-734
58. Pichlmayr R. Tacrolimus(FK506): Die Alternative in der Immunsuppression nach Organtransplantation? Herausgeber Neuhaus P. Verlag Pabst Publishers. 1995, S. 8-10
59. Qian S, Lu L, Fu F, Li Y, Li W, Starzl TE, Fung JJ, Thomson AW. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts evidence for deletion of cytotoxic T-cells and implications for tolerance induction. *J Immunol.* 1997, 158:4654-4661
60. Rifle G, Herve P. Regulatory (suppressor) T cells in peripheral allograft tolerance and graft-versus-host reaction. *Transplantation.* 2004, Jan 77(S1):S5
61. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkilä P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest.* 1999, May;29(5):369-71.
62. Settmacher U. Lebertransplantation heute. *Ärzteblatt Thüringen* 11/2006, S. 517-23
63. Sharland A, Yan Y, Wang Ch, Bowen D, Sun J, Sheil AG, McCaughan GW, Bishop GA. Evidence that apoptosis of activated t-cells occurs in spontaneous tolerance of liver allografts and is blocked by manipulations which break tolerance. *Transplantation.* 1999, 199: 68(11):1736-1745
64. Sharma R, Bagavant H, Jarjour WN, Sung SS, Ju ST. The role of Fas in the immune system biology of IL-2R knockout mice:interplay among regulatory T cells, inflammation, hemopoiesis and apoptosis. *The Journal of Immunology.* 2005, 175:1965-73

65. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Itoh Y, Hasegawa J, Yamabe K, Otsuki Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res.* 1996, May 1;56(9):2161-6.
66. Shirwan H, Wu GD, Barwari L, Liu A, Cramer DV. Induction of allograft non-responsiveness after intrathymic inoculation with donor class I allopeptides: evidence for persistent chronic rejection despite high levels of donor microchimerism. *Transplantation.* 1997, 64(12):1671-6476
67. Siegall CB, Helen HG, Haggerty HG, Warner GL, Chace D, Mixan B, Linsley PS, Davidson T. Prevention of immunotoxin-induced immunogenicity by co-administration with CTLA4Ig enhances anti-tumor efficacy. *J Immunol.* 1997, 159:5168-5173
68. Sriwatanawongsa V, Davies HS. The essential roles of parenchymal tissue and passenger leucocytes in the tolerance induced by liver grafting in rats. *Nat Med.* 1995, 1(5):428-32
69. Starzl TE. Saga of liver replacement, with particular reference to the reciprocal influence of liver and kidney transplantation (1955-1967). *J Am Coll Surg.* 10/2002, 195(5): 587-610
70. Starzl TE. Colloquium Chimerism and tolerance in transplantation. *PNAS* 10/2004, 101(2): 14607-14614
71. Starzl TE. The Mistique of organ transplantation. *J Am Coll Surg.* 2005(2):160-170
72. Steimann J. T-Lymphozytenfunktion und klinische Transplantation in vitro-Untersuchungen an himanen alloreaktiven T-Lymphozyten. Wolfgang Pabst Verlag, Langerich-Berlin-Riga-Zagreb. 1993, Seite 23-28
73. Strepkowski SM, Kirken RA, Trawick BW, Wang M, Teypal N, Wang ME, Tian L, Clark J, Kahan BD. Allochimeric class I MHC protein induced tolerance by partial TCR engagement requires activation of both CTLA- and common gamma chain –dependent cytokine signals. *Transplantation.* 2002, 73:1227-1235
74. Sun J, Wang C, France M, Sheil A. Increased Fas - ligand expression and activated T-lymphocyte apoptosis in islet graft tolerance induced by liver transplantation. *Transplant Proc.* 2001, 33:227-228
75. Sun Z, Wada T, Maemura K, Uchikura K, Hoshino S, Diehl AM, Klein AS. Hepatic allograft- derived kupffer cells regulate T-cell response in rats. *Liver Transplantation.* 2003(5):489-97
76. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Lang P, Grinyo J, Halloran PF, Solez K, Hagerty D, Levy E, Zhou W, Natarajan K, Charpentier B. Co-stimulatory blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2005 Aug 25:353(8):770-81

77. Waldmann H. Transplantation tolerance-where do we stand? *Nature Med.* 1999, 5:1245-1248
78. Wang C, Sun J, Li L, Wang I, Dolan P, Ross SA. Conversion of pancreas allograft rejection to acceptance by liver transplantation. *Transplantation.* 1998, 65(2):188-192
79. Wang Z, Larregina T, Shufesky WJ, Perone MJ, Montecalvo A, Zahorchak AF, Thomson AW, Morelli AE. Use of the Inhibitory effect of apoptotic cells on dendritic cells for graft survival via T-cell deletion and regulatory T-cells. *Am J Transplant.* 2006, 6:1297-1311
80. Wekerle T, Kurtz J, Sayegh MH, Ito H, Wells AD, Bensinger S, Shaffer J, Turka LA, Sykes M. Peripheral deletion after bone marrow transplantation with costimulatory blockade has features of both activation-induced cell death and passive cell death. *J Immunol.* 2001, 166:2311-2316
81. Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng X, Wu X, Nuñez G, Tang A, Sayegh M, Hancock W, Strom TB, Turka LA. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med.* 1999, 5(11):1303 – 1307
82. Zavazava N, Kabelitz D. Alloreactivity and apoptosis in graft rejection and transplantation tolerance. *J Leukoc Biol.* 2000, 68:167-174
83. Zimmermann FA et Davis HS. Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the rate of the graft. *Transplantation.* 1984, 37(4): 406-10
84. Zheng XX, Markees TG, Hancock WW, Li Y, Greiner DL, Li XC, Mordes JP, Sayegh MH, Rossini AA, Strom TB. CTLA-4 Signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment. *J Immunol.* 1999, 162:4983-4990
85. Yamada A, Sayegh MH. The CD154-CD40 costimulatory pathway in transplantation. *Transplantation.* 2002, 73(1):36-39
86. Yan Y, Shastry S, Richards C, Wang C, Bowen DG, Sharland AF, Painter PM, McCaughan GW, Bishop AG. Posttransplant administration of donor leukocyte induces long-term acceptance of kidney or liver transplants by an activation associated immune mechanism. *J Immunol.* 2001, 166:5258-5264
87. Yin DP, Sankary HN, Williams J, Krieger N, Garrison Fathman C. Induction of tolerance to small bowel allografts in high-responder rats by combining anti-CD4 with CTLA-4Ig. *Transplantation.* 1996, 62(11):1537-1539
88. Yan Y, Shastry S, Richards C, Wang Ch, Bowen DG, Sharland AF, Painter DM, McCaughan GW, Bishop AG. Posttransplant Administration of Donor Leukocytes Induces Long-Term Acceptance of Kidney or Liver Transplants by

an Activation-Associated Immune Mechanism. J Immunol. 2001, 166: 5258-5264

89. Yamada A, Sayegh MH. The CD154-CD40 costimulatory pathway in transplantation. Transplantation. 2002, 73(1):36-39

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei dem ärztlichen Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie an der Charité, Campus Virchow, Herrn Prof. P. Neuhaus, für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation in seiner Klinik durchführen zu können.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. V. Schmitz bedanken, der meine Doktorarbeit betreut hat. Großen Dank insbesondere für seine tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit und weiteren Dank für die vielen hilfreichen Anregungen, die Mühe und Geduld.

Einen besonderen Dank zur Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. UP Neumann, Herrn D. Polenz, Frau S. Lippert, Frau A. Schirmeier und Frau S. Boas-Knoop aussprechen. Ich danke euch ganz herzlich.

Ein weiteres herzliches Dankeschön geht an meine Familie und meinen Freunde, die mir in schwierigen Momenten seelisch und moralisch beigestanden haben.

## **11. Lebenslauf**

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

## 12. Erklärung

Ich, Kremena Kirilova , erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Effizienz einer Vorbehandlung mit CTLA-4lg und adoptivem Zelltransfer zur Vermeidung akuter Abstoßungen nach Lebertransplantation im Rattenmodell “** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift