

## 2. Einfluß der heterologen Immunität auf die Toleranzinduktion (P1/P2)

Der Erfolg der Organtransplantation, die bei akutem oder chronischem Organversagen ein etabliertes Therapieverfahren darstellt, wird durch verschiedene Faktoren limitiert. Beispiele hierfür sind v.a. die chronische Transplantatabstossung, die mit organspezifischen Besonderheiten bei allen Organtransplantationen auftreten kann, aber auch Nebenwirkungen der Immunsuppression wie z.B. die Tumorneogenese. Als einer der wesentlichen limitierenden Faktoren muß aber die chronische Transplantatdysfunktion/Abstossung angesehen werden. Dabei sind pathophysiologisch zeigen sowohl klinische, als auch experimentelle Untersuchungen einen Prozeß auf, der durch multiple Risikofaktoren bedingt ist. Hierbei erscheinen sowohl spezifische immunologische oder Alloantigen-abhängige Faktoren, wie die akute Abstoßungsreaktion und der Grad der HLA-Inkompatibilität, als auch eine Reihe von immunologisch- unspezifischen oder Alloantigen- unabhängigen Faktoren von Bedeutung zu sein. Ischämie-/Reperfusionsschaden, virale, insbesondere CMV-Infektionen, das Verhältnis von Organmasse zu Körpergewicht, Hyperlipidämien, arterieller Hypertonus, sowie Dosis und Nebenwirkungen der Immunsuppression seien beispielhaft genannt [1-4]. Unklar bleibt bei dieser hypothetischen Vorstellung der Pathophysiologie die Bedeutung der einzelnen Risikofaktoren sowie deren Interaktion.

Neben der therapeutischen Beeinflussung der genannten unspezifischen Einflußfaktoren ist die Induktion einer operationalen Toleranz, d.h. eines langfristigen Transplantatüberlebens unter Umgehung einer permanenten Immunsuppression, Schwerpunkt der modernen Transplantationsforschung.

Die Möglichkeit einer Toleranzinduktion wurde in verschiedenen Tiermodellen auf dem Boden unterschiedlicher Mechanismen nachgewiesen. Derzeit wird die Überführung ausgewählter dieser Protokolle auf die Humansituation vorbereitet, was sich auch in der Gründung des Immune Tolerance Networks der National Institutes for Health, Bethesda, USA, widerspiegelt. Erste Pilotstudien zur Toleranzinduktion sind bereits angelaufen. Bisher konnte ein Erfolg nur nach der Induktion von Makrochimerismus beobachtet werden, allerdings nur in Spender/Empfängerkonstellationen mit guter HLA-Übereinstimmung [5]. Jedoch gibt es noch eine Vielzahl offener Fragen, die bei der Überführung auf den Menschen von Bedeutung sind. Besondere Risiken, wie z.B. die Interaktion von Infektionen und Toleranzinduktion, sind bislang noch unzureichend und wenig untersucht.

Eine operationale Toleranz wird angenommen, wenn ein Transplantat ohne permanente Immunsuppression bei Erhalt der normalen Immunkompetenz gegen andere Antigene langfristig überlebt. Es ist mittlerweile offenkundig, daß Toleranzinduktion eher aktive

Immunprozesse [6] statt der bloßen Abwesenheit einer Immunantwort erfordert und daß an diesem Vorgang multiple Mechanismen beteiligt sein können. Prinzipiell wird zwischen einer zentralen und einer peripheren Toleranz, denen offensichtlich verschiedene Mechanismen zugrunde liegen, unterschieden. Allerdings zeigen neuere experimentelle Studien, daß diese Trennung nur bedingt richtig ist, da die Mechanismen ineinander übergreifen. Unter den bisher nachgewiesenen Mechanismen sind (I) klonale Deletion, (II) klonale Anergie [7], (III) klonale Ignoranz und (IV) aktive Suppression zu nennen. Klonale Deletion wird als die Grundlage der zentralen, Thymus-vermittelten Toleranz angesehen [8] und ist von besonderer Stabilität. Toleranz gegenüber dem Allotransplantat konnte hiermit für hochimmunogene primäre Hauttransplantate und intestinale Transplantate mit weitgehendem MHC-Mismatch gezeigt werden. Andere vaskularisierte Transplantate, wie z.B. Leber, Herz und Nieren erwiesen sich unter Verwendung anderer Toleranzinduktionsregime in Nagetieren als tolerogen, jedoch steht die Übertragung in die klinische Situation noch aus. Dies ist auch dadurch bedingt, daß die zu Grunde liegenden Mechanismen erst unvollständig verstanden sind [9].

Während zentrale Toleranz experimentell in Mäusen nach T-Zelldepletion und intrathymischer Applikation von Alloantigenen induziert wurde [10], ist die Anwendung im Menschen jedoch durch das derzeit nicht kalkulierbare Risiko des Injektionsvorganges und der Langzeitfolgen der intrathymischen Applikation sehr kritisch zu sehen. Hinzu kommt, daß dieses Procedere im Großtier bisher nicht erfolgreich war. Zentrale Toleranz kann aber, im Gegensatz zu den obig erwähnten anderen Protokollen, offensichtlich auch durch periphere Gabe von Alloantigenen erreicht werden. Ein Modell hierfür ist der Knochenmarks-Chimerismus, der auch bereits im Menschen erfolgreich induziert wurde [11-16].

Nach subletaler Ganzkörper-Irradiation wurde in Mäusen eines Stammes A eine Rekonstitution des Knochenmarks mittels Knochenmark eines Stammes B durchgeführt. Es entstanden Knochenmarks-chimäre Mäuse des Stammes A, die tolerant gegenüber Antigenen des Stammes B waren. Um diesen Ansatz klinisch einsetzbar zu machen, müssten jedoch andere Konditionierungsregime, d.h. niedrigere Bestrahlungsdosen bzw. non-myeloablative Regime etabliert werden. Dies kann z.B. durch Kombination aus Ganzkörperbestrahlung in niedrigerer Dosis und Kostimulationsblockade, d.h. Gabe von monoklonalem anti-CD154(CD40L)-Antikörper (mAk) [17,18], bzw. anti-CD154(CD40L)-mAk und CTLA4-Ig [19-21], erzielt werden. Ein nicht-myeloablatives Protokoll basierend auf niedrig dosierter Bestrahlung, niedrig dosiertem Cyclophosphamid und hochdosiertem Antithymozytenglobulin wurde bei Patienten mit Plasmozytom und Niereninsuffizienz erfolgreich angewendet. Die Lebendspendernieren der verwandten Knochenmarkspender wurden bei einigen Patienten ohne weitere Immunsuppression nun schon für mehrere Jahre

akzeptiert [22]. Das Protokoll birgt jedoch für eine Übertragung auf Patienten ohne Tumorerkrankung noch zu hohe Risiken und ist für nicht HLA-gematchte Leichenspende-Transplantationen nicht erprobt.

Periphere Toleranz wurde von Fabre und Morris [23,24] bereits 1972 nach Gabe von donorspezifischen Bluttransfusionen nachgewiesen. Tierexperimentelle Modelle stützen dabei mehr die Hypothese eines aktiven (dominante Regulation/Suppression), denn eines passiven (Anergie) Vorganges [25]. Ein Beweis für diese These ergibt sich z.B. aus der Beobachtung der infektiösen Toleranz. Nach der Übertragung von Milzzellen einer für ein allogenes Hauttransplantat toleranten Maus auf eine T-Zell depletierte Maus desselben Stammes (kein Thymus + CD4 und CD8-Blockade) können Milzzellen einer unbehandelten Maus des entsprechenden Stammes (naive Milzzellen) die gegenüber dem Hauttransplantat bestehende Toleranz nicht durchbrechen [26]. Dies ist inkonsistent mit dem Modell der Anergie. Nachfolgende Experimente bewiesen die Effektivität dieser dominanten Regulation, indem serielle Transfers von Zellen über zehn Stationen erfolgreich durchgeführt wurden [27]. Erklärungsversuche der dominanten Regulation beinhalten das Modell der „Linked Epitope Suppression“ und weisen auf eine wesentliche Rolle der Th2-Zellen hin [28].

Mögliche, klinisch anwendbare periphere Toleranzinduktionsregime basieren zum einen auf der Modifikation des 1. Signals der T-Zell-Erkennung, z.B. durch nicht-depletierende anti-CD4-mAk [28], anti-CD3-mAk [29], oder einer Kostimulationsblockade (2.Signal) durch kombinierte Gabe von CTLA4-Ig und anti-CD40L-Antikörpern [20,24,25].

Der bisherige Schwerpunkt der Toleranzforschung lag somit auf der Entwicklung klinisch anwendbarer, effektiver und vom Nebenwirkungsprofil vertretbarer Toleranzinduktionsprotokolle, die im vorangegangenen Kapitel kursorisch beschrieben wurden. Jedoch fehlen zum einen Marker, um einen toleranten Zustand zu messen, zum anderen ist unbekannt, wie stabil und wie sicher der erreichte Zustand ist. Der derzeit valideste Marker ist das Ausbleiben einer chronischen Rejektion in Hochrisiko-Spender-Empfänger-Modellen bzw. die Akzeptanz von Hauttransplantaten mit komplettem MHC-Mismatch. Mit der Entwicklung von präklinischen Toleranzinduktionsmodellen im Primatenmodell treten weitere Fragestellungen in den Vordergrund, wie z.B. Sicherheitsaspekte bzw. die Frage, welche Faktoren den toleranten Zustand durchbrechen können.

Es ist daher unbedingt notwendig, Toleranzinduktions-Regime, die zukünftig eine klinisch bedeutsame Strategie darstellen könnten, auf ihre Stabilität gegenüber klinisch relevanten viralen Infekten zu überprüfen.

Dies trifft u.a. auf Toleranzinduktions (TI) –Regime zu, die sich einer Signal 1 Modifikation bedienen, wie z.B. die Verwendung von monoklonalen anti-CD3 Antikörpern [30].

In diesem Kontext untersuchten wir den Einfluß von Ratten-Zytomegalievirus (RCMV – Maastricht Stamm) auf ein über Signal 1-Modifikation vermitteltes Toleranzmodell nach Ratten-Nierentransplantation [P1]. Zum Einsatz kam dabei ein nicht-depletierender monoklonaler anti-CD4 Antikörper (RIB 5/2) Modell, von dem bereits die Induktion einer robusten Toleranz mit einem Langzeitüberleben über 300 Tage in starken Spezieskombinationen (z.B. Dark Agouty (DA) -> Lewis (LEW)) beschrieben war [30-32]. Lediglich hochdosierte IL-2 Applikation während der Induktionsphase konnte diesen toleranten Zustand durchbrechen. The resulting stable tolerant state was not breakable by exogenous IL-2 or alloreactive memory T cells if given after day 100. [321]. Dabei ist die a) However, anti-CD4 – induzierte Toleranz trotz der Persistenz von alloreaktiven T-Zellen stabil, was eine Bedeutung aktiver, Toleranz-erhaltender Mechanismen nahe legt. Die RIB5/2 - vermittelte Toleranz kann adoptiv durch regulative T-Zellen transferiert werden, die aus dem Transplantat oder später (>30 Tage) aus der Milz isoliert wurden [332]. Die in vivo und in vitro As one of the potential underlying mechanisms, the RIB 5/2- associated T helper (Th) 1/Th2 shift was proposed to be involved in the regulatory process by effectively blocking Th1 responses. [12] RIB 5/2 – Behandlung unterdrückt die IL-2 Produktion alloreaktiver T-Zellen komplett. Hierfür wurde weniger eine Suppression der IFN- $\gamma$  mRNA-Expression als eine Interferenz von RIB 5/2 mit posttranskriptionalen Mechanismen zur Kontrolle der IFN- $\gamma$  -Produktion während der Alloaktivierung von T-Zellen angenommen. Weitere Untersuchungen erbrachten eine Addition of high-dose IL-2 but not IL-15 to anti-CD4-treated alloactivated T cells restored IFN- $\gamma$  protein production without leading to enhanced IFN- $\gamma$  mRNA expression. verminderte Aktivierung des Translation-initiiierenden Faktors eIF2 $\alpha$  in anti-CD4-behandelten T-Zellen als zu Grunde liegenden Mechanismus. Exogenes Interleukin-2 führte zu einer Reversibilität dieses Vorganges [343].

Als Grundlage für die geplanten Infektionsversuche im obig beschriebenen TI-Modell war die Entwicklung adäquater Monitoring- Methoden zum Nachweis alloreaktiver und RCMV-reaktiver T-Zellen notwendig. Dazu wurde im Rahmen eines ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe etablierten Nierentransplantationsmodelles zum Einfluß der Immunoseneszenz auf das Langzeitüberleben nach Nierentransplantation ein IFN- $\gamma$  Sekretions – ELISPOT- Assay zum Nachweis alloreaktiver (DA-spezifischer) und RCMV-reaktiver T-Zellen entwickelt, sowie die durchflußzytometrische Messung der intrazellulären Zytokinsekretion im Rattenmodell etabliert [P2, 35]. Die ELISPOT-Technologie wurde auf Grund der geringen Ausgangsfrequenzen alloreaktiver und RCMV-reaktiver Gedächtnis - T-Zellen in naiven Ratten notwendig, die wegen ihrer keimarmen Aufzucht wenig immunologische Erfahrung und damit wenige Gedächtniszellen aufweisen.

Die Versuchsplanung berücksichtigte die verschiedenen zeitlichen Konstellationen zwischen CMV-Infektion und Toleranzinduktion. Zur Simulierung eines Empfängers mit RCMV-reaktivem Gedächtnis und anschließender CMV-Reaktivierung, eines naiven Empfängers bzw. einer sekundären Infektion nach Toleranzinduktion erfolgten RCMV-Infektion vor TI, zum Zeitpunkt der TI bzw. zu einem späteren Zeitpunkt. Dazu erfolgte in einem orthotopen Ratten-Nierentransplantations (NTx)-Modell (Dark Agouty (DA) -> Lewis (LEW)) eine Toleranzinduktion mittels RIB 5/2 (10mg/kg KG; Tag -1,0,1,2,3; s.c.) ohne weitere Intervention, bzw. mit RCMV-Infektion (RCMVI) ( $5 \times 10^5$  Plaque forming units (PFU) i.p.) simultan zur NTx, 50 Tage nach NTx, bzw. 14 Tage vor und 14 Tage nach NTx. Als Kontrollen wurden isogene NTx (Lew->Lew) ohne TI, isogene NTx mit TI und simultaner RCMVI, und allogene NTx (DA-LEW) ohne TI mit oder ohne gleichzeitige Nephrektomie durchgeführt [P1].

are different in various models RCMVI induzierte in keiner der Konstellationen ein akutes Durchbrechen der Toleranz, interferierte jedoch mit der Langzeitstabilität des toleranten Zustandes; d.h. alle mit RCMV infizierten Tiere entwickelten unabhängig davon, ob die RCMVI vor, während oder nach der TI stattfand, jedoch in zeitlicher Abhängigkeit vom Infektionszeitpunkt eine chronische Allotransplantat - Schädigung.

Die However, recipient and graft survival were not influenced within the observation period. RCMVI rief außerdem eine erhebliche alloreaktive aber auch RCMV – reaktive Immunantwort hervor, wie an den deutlich erhöhten Frequenzen RCMV-reaktiver und alloreaktiver Typ 1 – Gedächtnis-T-Zellen abzulesen ist. Die aufgezeigten Daten weisen möglicherweise auf eine wechselseitige Interferenz zwischen RCMV -Infektion und Alloreaktivität hin. Die alleinige Allotransplantation ohne sekundäre RCMV-induzierte jedoch ebenfalls eine signifikante Immunantwort gegen RCMV. Letztere Befunde weisen auf Kreuzreaktivität oder sog. Bystander-Aktivierung als ursächliche Mechanismen für das Durchbrechen der Toleranz und Induktion der chronischen Transplantat - Schädigung hin [P1].