

5. Diskussion

5.1. Einfluß der heterologen Immunität auf die Toleranzinduktion

Die Übersetzung von experimentell etablierten Toleranzinduktions (TI)- Protokollen in die klinische Praxis wird durch verschiedene interferierende Probleme bzw. Phänomene, wie z.B. T-Zell-Gedächtnis, homeostatische Proliferation und heterologe Immunität erschwert. Unter heterologer Immunität wird die Tatsache verstanden, daß eine vorangegangene immunologische Exposition und das daraus resultierende T-Zell-Gedächtnis den Verlauf zukünftiger Immunreaktionen auf nicht verwandte Pathogene beeinflussen kann [84]. Als für die Toleranzinduktion relevantes Beispiel kann ein Virus-induziertes alloreaktives T-Zell-Gedächtnis genannt werden. Das Phänomen der heterologen Immunität wurde erst in der näheren Vergangenheit als unterschätztes Hindernis für die Toleranzinduktion erkannt [85], gleichwohl bereits gewisse Daten zuvor darauf hinwiesen [86-89]. Besonders bei Verwendung T-Zell depletierender immunsuppressiver Regime, die den alloreaktiven Gedächtniszell-Pool aussparen, könnte die homeostatische Proliferation dieser residuellen alloreaktiven Gedächtnis- T-Zellen eine erhebliche Gefahr für das Transplantat darstellen. Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der genannten Problematik. Vorbehandlung von Mäusen mit Donor-spezifischen Transfusionen und einem monoklonalen anti-CD154 Antikörper vor Hauttransplantation führte zu einem Langzeit - Transplantatüberleben, das mit einer Deletion von CD8(+)-T-Zellen zum Zeitpunkt der Toleranzinduktion assoziiert war [90]. Eine Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) kurz nach Hauttransplantation verhinderte ein Langzeit-Überleben; dies wurde sowohl einer ausbleibenden Deletion von CD8(+)-T-Zellen als auch einem aktivierten Phänotyp zugerechnet. Im Gegensatz dazu führten Infektionen mit einem murinen Zytomegalie-Virus (MCMV) und dem Vaccinia Virus (VV) im entsprechende Modell nicht zu einer Änderung des Langzeit-Überlebens. Ebenso hatte die LCMV-Infektion 50 Tage nach TI keine Auswirkung. Gegensätzliche Daten stammen aus einem Toleranzinduktionsmodell basierend auf CTLA4-Ig, anti-CD40L und Busulfan. In diesem Modell führten Infektionen mit LCMV, VV oder dem vesikulären Stomatitis Virus (VSV) in Mäusen zur Bildung von alloreaktiven Gedächtnis-T-Zellen, die zu einer Toleranzresistenz führten [85]. Als für die Abstoßung ursächlich wurden There was aCD8+ zentrale Gedächtnis-T-Zellen identifiziert. Des weiteren postulierten die Autoren eine Hierarchie für die Empfänglichkeit zur Toleranzinduktion: so seien naive Tiere in uniformer Weise gegenüber TI sensibel. Empfänger, die gegenüber einer singulären Infektion exponiert waren, zeigten demnach eine geringere Sensitivität gegenüber TI; nach repetitiven Infektionen, d.h. in immunologisch "erfahrenen" Empfängern, sei eine komplette Refraktärität gegenüber TI vorhanden.

Die Übertragbarkeit dieser Daten in den humanen Bereich scheitert jedoch an der Tatsache, daß Kostimulationsblockade nicht zu einer verlässlichen Toleranzinduktion in nicht-humanen Primaten und Menschen führt. Nicht nur dieser Umstand zeigt, daß eine erhebliche Heterogenität an Daten in Abhängigkeit vom verwendeten TI-Protokoll und dem eingesetzten viralen Erreger besteht.

Wir sahen es daher als indiziert an, andere TI-Regime, die zukünftig klinisch bedeutsamen Strategien ähneln, auf ihre Stabilität gegenüber klinisch relevanten viralen Infekten zu überprüfen. Dies trifft u.a. auf TI-Regime, die sich einer Signal 1 Modifikation bedienen, wie z.B. monoklonale anti-CD3 Antikörper [30], zu.

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. Dies kontrastiert zu den publizierten Ergebnissen im Mäuse-Transplantationsmodellen, in denen eine Exposition mit viralen Erregern, z.B. LCMV, zu einem unmittelbaren Transplantatversagen und Ableben des Empfängers führte [85]. Des weiteren konnten wir die postulierte Hierarchie der Empfänglichkeit für störende Einflüsse der RCMVI auf den toleranten Zustand nicht nachvollziehen.

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 - Nephropathie hin [P1].

Die Kreuzreaktivitäts-Hypothese wird durch unsere Beobachtung gestützt, daß sowohl Alloreaktivität per se eine relevante RCMV-reaktive Immunantwort induzierte als auch die RCMV-Infektion eine alloreaktive Immunantwort triggerte. Als Beispiel zur Erklärung des Durchbrechens der RIB 5/2 induzierten Toleranz durch RCMV kann aus dem humanen Bereich die kreuzreaktive Kombination zwischen für HLA-B8-restringierten Epstein-Barr virusspezifischen T –Zellen mit HLA B44 herangezogen werden. Mit dem HLA-B8/B44 Kreuzreaktivitäts-Paar korreliert ein reduziertes Allotransplantatüberleben in einer Analyse des Nierentransplantationsregisters [911]. In Analogie zu diesen Befunden enkodiert das

Maastricht – RCMV ein Polypeptid - Homolog zu MHC I – Schwerketten (Produkt des r144Gens) [922]. Die Infektion der Empfängertiere vor, während und nach Toleranzinduktion könnte somit einen starke, kreuzreaktive alloreaktive Immunantwort induzieren, die mit dem Genprodukt des r144-Gens in Zusammenhang steht.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann nicht abschliessend bewertet werden, ob die beschriebenen Effekte als allgemeingültig anzusehen sind oder auf bestimmte Toleranzinduktionsregime und virale Erreger beschränkt sind.

Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, daß das Ausmaß der Interferenz zwischen heterologer Immunität und Alloreaktion sowohl vom gewählten Toleranzinduktionsregime als auch vom entzündlichen Agens abhängt. Die erhobenen Daten weisen außerdem auf die Wichtigkeit von Standards für die Infektprophylaxe bei der Durchführung von zukünftigen Toleranzinduktionsstudien hin.

5.2. Überwindung der initialen Immunbarriere in der Xenotransplantation

Die Entwicklung transgener, humane Komplementregulationsproteine exprimierender Schweine stellte einen Meilenstein in der Entwicklung der Xenotransplantation dar. Trotz der ermutigenden Daten aus *in vitro* und ersten *in vivo* Experimenten überlebten hDAF-transgene Schweineorgane in nicht-humanen Primaten allerdings nicht länger als 3 Monate [68]. Kürzlich veröffentlichte Daten zeigten, daß hDAF exprimierende Schweineorgane trotz intensiver Immunsuppression der als Empfänger verwendeten Primaten weiterhin durch humorale Mechanismen abgestoßen wurden [38,69,70].

Einen Fortschritt könnte die im Jahre 2003 geglückte erfolgreiche Aufzucht der für die Galaktosyltransferase homozygot defizienten Knockout – Schweine (GT-KO) sein, die das wesentliche Xenoantigen Gal nicht exprimieren [93]. GT-KO Schweineherzen, die heterotop in immunsupprimierte Paviane transplantiert wurden, überlebten annähernd 80 Tage, manche bis 180 Tage [94]. Obgleich dies als signifikanter Fortschritt beschrieben wurde, bedürfen die Daten einer kritischen Bewertung, da es sich weder um ein lebensunterstützendes Transplantationsmodell handelte, noch die Überlebensdaten signifikant über denen von hDAF-transgenen Schweineherzen lagen. Einige der transplantierten Organe zeigten trotz Vollheparinisierung eine thrombotische Mikroangiopathie. Eine weitere transgene Modifikation, die Expression der humanen $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase, zur Produktion Gal-defizienter Tiere, die gleichzeitig das H -Antigen aufweisen, wurde beschrieben [95]. Dies könnte zukünftig sowohl die transgene Expression von hDAF als auch die Anwendung von löslichen Gal –Glykokonjugaten zur Neutralisation von Xenoantikörpern ersetzen.

Auf Grund der erheblichen immunologischen und physiologischen Hürden wurden die präklinischen experimentellen Modelle für die Leber-Xenotransplantation in der jüngeren Vergangenheit nicht so weiter entwickelt wie in der Herz- und Nieren-Xenotransplantation. In *ex-vivo* Leberperfuisionsversuchen wurde allerdings eine Wirksamkeit der transgenen Expression humaner Komplementregulationsproteine, z.b. humaner Decay Accelerating Factor (hDAF), zur Verhinderung der hyperakuten Abstoßung nachgewiesen [P3,P4]. Inzwischen erfolgte der erfolgreiche klinische Einsatz von für hDAF (CD55) und hCD59 transgenen Schweinelebern in der extrakorporalen Leberperfusion (ECLP) zur Überbrückung (bridging) von Patienten im akuten Leberausfall bis zu einer Lebertransplantation [96]. Die Patienten befanden sich fünf bzw 18 Monate nach Lebertransplantation in gutem Gesundheitszustand. Kritisch betrachtet ist allerdings der kausale Zusammenhang zwischen klinischem Erfolg und der extrakorporalen Leberperfusion nicht bewiesen. Es ist vielmehr

Gegenstand der Diskussion, ob zur extrakorporalen Leberperfusion die transgene Modifikation von Schweinelebern mit humanen Regulationsproteinen überhaupt notwendig ist, da Patienten im Leberversagen charakteristischerweise kaum Komplement produzieren. Zudem können bei optimaler Perfusionstechnik extrakorporale Perfusionszeiten von über 24 Stunden unter Verwendung nicht-transgener Schweinelebern erreicht werden.

Auch in der Leber-Xenotransplantation ist die Bedeutung des Komplementsystems noch umstritten. Die nach Pavianleber-Transplantation aufgetretene Hämolyse wurde auf von der Pavianleber produziertes Komplement zurückgeführt [97]. Vor dem Hintergrund der Diskussion, ob für die klinische Leber-Xenotransplantation eine effizientere Komplementregulation notwendig ist, als in den bisher hergestellten transgenen hDAF-Schweinen erreicht wurde, stellt sich die Frage, ob eher das xenogene Transplantat durch das Empfänger-Komplement oder der Empfänger durch das dann produzierte xenogene Komplement gefährdet ist. Es ist somit fraglich, ob das Transplantat mehr an Komplement-Regulationsproteinen des Menschen oder eher der verwendeten Spezies exprimieren muß, um so den Empfänger vor der schädlichen Wirkung xenogener Komplementfaktoren zu schützen [97-99]. Dies ist vor allem für die Verwendung diskordanter Schweinelebern von besonderem Interesse, da Paviane aus ethischen und Verfügbarkeitsgründen heute nicht mehr als akzeptable Organquelle angesehen werden können [100]. Schweine stellen jedoch eine diskordante Organquelle dar, in denen die angesprochenen Unterschiede noch weitaus größer sind. Sollte es mit Hilfe transgener Modifikationen, Immunsuppression und anderen Maßnahmen möglich sein, die hyperakute und später zelluläre Abstoßung zu verhindern, so scheint eine gewisse Skepsis zur physiologischen Kompatibilität von xenogenem Transplantat und Empfänger indiziert. Diese Deutung gründet auf der Untersuchung aller weltweit verfügbarer klinischen Daten über den Einsatz der xenogenen und allogenen ECLP [P6]. Die univariate und multivariate statistische Auswertung der vollständig erfassbaren klinischen Daten zeigte keinen Überlebensvorteil der ECLP mit Schweinelebern gegenüber der konventionellen Intensivtherapie. Pavianlebern und humane Lebern resultierten demgegenüber in signifikant besserem Überleben [6]. Die baldige klinische Xenotransplantation von Lebern in diskordanter Konstellation (Schwein auf Mensch) muss daher aufgrund der grossen physiologischen Inkompatibilitäten weitaus skeptischer eingeschätzt werden als eine Xenotransplantation von Herz und Nieren.

Die potentielle Übertragung von Krankheitserregern von Schweinen auf Menschen ist seit den Berichten über eine in vivo Infektion humaner Zelllinien mit porcinen endogenen Retroviren (PERV) [101,102] wesentlicher Bestandteil der Diskussion über die Zukunft der Xenotransplantation. In in vitro und in vivo Versuchen [103] konnte bisher keine Transmission von PERV von Schweine-Endothelzellen auf Paviane festgestellt werden,

obwohl in den verwendeten Zellreihen (PAEC-Porcine Aorten-Endothelzellen) PERV-mRNA nachgewiesen wurde und eine Freisetzung von Viruspartikeln stattfand. Bisher liegt auch aus den bisher durchgeführten klinischen Anwendungen porciner Organe, einschliesslich der Bioreaktorsysteme auf porciner Basis [104], kein Bericht über eine Übertragung von PERV vor. Unabhängig davon muss vor einer eventuellen klinischen Anwendung der Xenotransplantation eine weitere Klärung der potentiellen infektiologischen Risiken erfolgen, da auch andere virale Erreger durchaus von Bedeutung sein könnten.

So wurde nach der 1992 durchgeführten, bisher erfolgreichsten, Leber-Xenotransplantation in seriellen Untersuchungen am Tag 29, 36 und 42 nach Transplantation CMV-DNA im peripheren Blut entdeckt. Am Tag 29 wurde sowohl Genom des Pavian-Cytomegalievirus als auch humanes CMV-Genom gefunden. Dies ist somit der erste Bericht über die Übertragung eines Replikations-kompetenten tierischen Virus auf einen Menschen im Rahmen einer Xenotransplantation [105,106]. Für das porcine CMV wurde eine Rolle in der Auslösung einer in dem xenogenen Nierentransplantationsmodell Schwein-Pavian oftmals auftretenden Verbrauchskoagulopathie diskutiert [107].

Nicht zuletzt die Frage der Beherrschbarkeit bzw. Verhinderung von xenogen übertragenen Infektionen wird im weiteren die Entwicklung der Xenotransplantation mit beeinflussen.

5.3. Antiinflammatorische Immunsuppression in der Dünndarmtransplantation

Die Dünndarm- und Multiviszeraltransplantation stellt auf Grund der hohen Immunogenität des transplantierten Dünndarmes einer der größten Herausforderungen an die Transplantationsmedizin dar. Sie wurde daher bis auf wenige Einzelfälle bis Ende des letzten Jahrzehntes nur sporadisch durchgeführt. Basierend auf den Fortschritten in der immunsuppressiven Therapie entwickelte sich die Dünndarmtransplantation in den vergangenen Jahren zu einem klinisch einsetzbaren kausalen Therapieverfahren des Kurzdarmsyndromes. Neben der Etablierung des Verfahrens im Transplantationszentrum der Berliner Charité, die auch eine der ersten erfolgreichen achtfach - Multiviszeraltransplantationen weltweit einschloß, standen in der vorliegenden Arbeit die Etablierung nicht-invasiver Monitoringverfahren und die Weiterentwicklung immunsuppressiver Strategien im Vordergrund. Hierbei kristallisierte sich der Einsatz von in der Morbus Crohn – Therapie bereits etablierter TNF- α Inhibitoren als besonders effektiv heraus.

Es ist bereits seit längerem bekannt, daß TNF- α eine zentrale Rolle in der Immunantwort auf Alloantigene spielt. In verschiedenen Studien wurde ein Anstieg der TNF- α Serumspiegel während der akuten Rejektion nach Leber-, Nieren-, und Pankreastransplantation nachgewiesen [108]. Dies trifft auch auf die Dünndarmtransplantation zu. In experimentellen Dünndarmtransplantationsmodellen wurde während der akuten Rejektion eine signifikante Hochregulation von IL-6, IFN- γ , und TNF- α festgestellt. Microarray-Untersuchungen mukosaler Biopsien von Patienten mit akuter Abstoßung nach Dünndarmtransplantation bestätigten dies [108].

Der Goldstandard der Abstoßungstherapie nach Dünndarmtransplantation besteht aus der Hochdosis -Steroidtherapie, OKT3 und Antithymocytenglobulin. Die für diese Therapie resistenten Rejektionen führen meist zum Transplantatverlust, der mit einer Mortalität von 50-80% vergesellschaftet ist, oder zur chronischen Abstoßung. TNF- α - Inhibition könnte ein neuartiges immunmodulatorisches Konzept zur Therapie anderenfalls therapieresistenter Abstoßungen nach Organtransplantation darstellen.

Basierend auf dem erfolgreichen Einsatz der TNF α - Inhibition in der OKT3-resistenten Rejektion wurde der weitere potentielle Einsatz von Infliximab evaluiert und Infliximab als OKT3-sparendes Agens bei zwei Patienten mit Steroid-resistenter Rejektion angewendet. Auch hier fielen erhöhte Serum- TNF- α - Werte zum Zeitpunkt der Rejektion und während der Methylprednisolon-Stoßtherapie auf. Entsprechend der Anwendung in der OKT3-resistenten Rejektion waren mehrfache Applikationen der Antikörpers bis zur vollständigen immunologische Stabilisierung notwendig. Die Gabe von Infliximab erfolgte individualisiert nach Serum- TNF α - und LBP -Werten. Im Gegensatz zu der erfolgreichen Anwendung bei

Patienten mit später Steroid- und OKT3-resistenter Abstoßung erwies sich der Einsatz bei einem Patienten mit früher, schwerer akuter OKT-resistenter Rejektion als nicht erfolgreich. Wegen der präliminären Natur der Daten zur frühen, refraktären Rejektion verbleibt die potentielle Rolle der TNF α - Inhibition für diese Anwendung unklar. Allerdings berichtete eine Arbeitsgruppe [109], die die prinzipielle Wirksamkeit der TNF α - Inhibition bei später Rejektionen nach Dünndarmtransplantation reproduzierten und bestätigten, ebenso über ein Therapieversagen bei einem Patienten mit früher akuter Rejektion. Es mag daher darüber spekuliert werden, daß die Dynamik der frühen schweren Rejektion auch durch TNF α -Blockierung nicht aufgehalten werden kann.

Als weiteres Indikationsfeld wurden sowohl von unserer als auch anderen Arbeitsgruppen [109] chronisch inflammatorische Veränderungen im distalen Dünndarmtransplantat identifiziert, die auf Grund der im Vordergrund stehenden inflammatorischen, z.T. circumskript ulzerativen Veränderungen und dem inkonsistenten Vorhandensein von Rejektionsmerkmalen als „chronische Transplantat-Enteropathie“ bezeichnet werden.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen keine klinischen Erfahrungsberichte zum Einsatz von anti-TNF α - Antikörpern als Steroidersatz und, wie in der Pankreasinzell-Transplantation untersucht [110], als Bestandteil einer Induktionstherapie vor. Ein weiteres Einsatzgebiet könnte die Reduktion der Calcineurin (CNI)-Dosis bei Patienten mit erheblicher CNI-induzierter Nephrotoxizität sein, wie für drei Patienten aus unserem Transplantationskollektiv beschrieben [P9,P10].

Zusammengefasst stellt die akute, therapierefraktäre TransplantatAbstoßung jedoch weiterhin den bedeutendsten Risikofaktor für den Transplantatverlust dar. Die anti-TNF alpha - Therapie könnte damit das immunsuppressive Arsenal in der DTx sinnvoll erweitern und dazu beitragen, die Rate an therapierefraktären Rejektionen zu vermindern.

Die genannten Überlebensraten nach DTx erfordern eine Neudefinition der Indikation zur Transplantation und eine Abgrenzung bzw. Neupositionierung gegenüber der konservativen Therapie des KDS. Die erfolgreiche DTx eröffnet die Möglichkeit zur vollständigen körperlichen, sozialen und beruflichen Rehabilitation. Dies wurde in mehr als 50% der in unserem Zentrum behandelten Patienten innerhalb eines Jahres erreicht [P9]. Zudem müssen zunehmend ökonomische Aspekte der Behandlung des KDS diskutiert werden. In einem aktuellen Review des Langzeitüberlebens und der ökonomischen Rahmenbedingungen beim KDS wird das 5-Jahresüberleben unter TPE mit durchschnittlich 70% beziffert. Obwohl durch heimparenterale Ernährung eine signifikante Reduktion der stationären Krankenhauskosten erreicht wurde, bezifferten Schalamon und Kollegen die jährlichen Kosten für Patienten mit KDS und TPE auf 100.000 bis 150.000 US \$. Eine erfolgreiche DTx war bereits nach zwei Jahren kostengünstiger als die TPE. Hierbei ist

jedoch eine differenzierte Betrachtungsweise der Ursachen des KDS anzumehmen. V.a. Patienten mit Ultra-KDS (<40cm Restdünndarmlänge beim Erwachsenen) kommen aufgrund des schlechten Langzeitüberlebens unter TPE für eine frühzeitige DTx in Frage [82,111].

Die aufgeführten Daten weisen auf mehrere Punkte hin, die bei der Indikationsstellung zur DTx wichtig sind:

Die Indikation zur DTx sollte, wenn eine intestinale Adaptation auf dem Boden der vorliegenden Restdünndarmlänge theoretisch möglich ist (d.h. bei Erwachsenen > 40-50cm), erst nach Ablauf der Adaptationsphase von ungefähr einem Jahr geprüft werden. Die Indikationsstellung sollte selektiv in Abhängigkeit von der zu Grunde liegenden Erkrankung, dem Patientenalter und dem Auftreten von Komplikationen der TPE gestellt werden. Sie sollte präferenziell vor dem Eintritt einer persistierenden und irreversiblen Leberdysfunktion erfolgen. Dies wird durch Daten des Dünndarmtransplantations-Registers (*Intestinal Transplant Registry*) gestützt, das einen deutlichen Einfluß der Erkrankungsschwere des Empfängers auf das Outcome nach DTx nachwies. Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation bettlägerig im Krankenhaus waren, zeigten eine signifikant schlechtere Prognose. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der früheren Vorstellung von Patienten mit Kurzdarmsyndrom in spezialisierten Zentren – insbesondere bevor lebensbedrohliche Komplikationen der TPE, d.h. TPE – assoziierte Lebererkrankungen und Katheterkomplikationen eintreten. Dies würde auch die hohe Rate an kombinierten Transplantationen – insgesamt ca 60% der DTx-Patienten – reduzieren. Die Weiterverbreitung der Vorstellungs- als auch Indikationskriterien zur DTx würde hiermit nicht nur den Zugang zur Transplantation für Patienten, die an einem KDS leiden, erleichtern, sondern auch die Erfolgsrate des Verfahrens günstig beeinflussen [82,111].