

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Gentransfer von Interleukin-10-Protein in die Kornea:
Untersuchungen zur Prävention der Transplantatabstoßung nach
perforierender Keratoplastik**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadine Dieste, geb. Schmidt

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Uwe Pleyer
2. Priv.-Doz. Dr. med. Joachim Wachtlin
3. Prof. Dr. med. Carl Erb

Datum der Promotion: 18.09.2009

Virchow über den Sinn der Prüfung

„Müssen wir für die Prüfung nicht Dinge lernen, die wir später nie wieder benötigen?“ beschwerte sich ein Student bei dem Mediziner Rudolf Virchow [...]. „Es ist unerlässlich, junger Freund“, erklärte Virchow, „dass der Arzt zumindest einmal im Leben auf der Höhe der Wissenschaft weilt.“

Rudolf Virchow 1856 in Berlin

1	EINLEITUNG.....	10
1.1	Die Kornea	10
1.2	Die Keratoplastik.....	12
1.2.1	Abstoßungsreaktionen nach Keratoplastik.....	12
1.2.2	Das Vorderkammer-Immunprivileg.....	17
1.3	Prävention der Immunreaktionen nach Keratoplastik.....	19
1.3.1	Neue Ansätze zur Prävention der Abstoßungsreaktionen	
	kornealer Transplantate	21
1.3.2	Gentherapie zur Modulation des kornealen Endothels	21
1.3.3	Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren	21
1.3.4	Vor- und Nachteile adenoviraler Vektoren	22
1.3.5	Modulation der immunvermittelten Transplantatabstoßung.....	22
1.3.6	Interleukin-10.....	23
1.3.7	Gentransfer von Interleukin-10 zur Modulation der Transplantatabstoßung...	24
1.4	Das Tiermodell.....	24
2	AUFGABENSTELLUNG	26
3	METHODIK.....	27
3.1	Experimentelles Modell	27
3.2	Methoden.....	28
3.2.1	Adenoviraler Gentransfer in ex-vivo-kultivierten Rattenkorneae.....	28
3.2.2	Experimentelles Keratoplastikmodell	29
3.2.3	Organentnahme und Lagerung.....	30
3.2.4	Kryostatschnitttechnik und Präparation der Gefrierschnitte	30
3.2.5	Immunhistochemische Färbung der Schnitte.....	30
3.2.6	Statistische Auswertung	32
3.2.7	Die Transplantatüberlebenszeit.....	33
3.3	Materialien	33
3.3.1	Monoklonale Antikörper.....	33
3.3.2	Verbrauchsmaterialien	34
3.3.3	Färbekits und Versuchssysteme	34
3.3.4	Lösungen und Puffer	34
3.3.5	Geräte, Messgeräte	35
3.3.6	Explantationsmaterialien.....	35
3.3.7	Adenovirale Konstrukte	35

3.3.8	Versuchstiere.....	35
4	ERGEBNISSE.....	36
4.1	Transplantatüberleben.....	36
4.2	Immunhistologische Untersuchungen.....	38
4.2.1	Vergleich der drei Behandlungsgruppen bezüglich der Zellzahl.....	39
4.2.2	Die verschiedenen Zellpopulationen.....	45
4.2.3	Die Verteilung der Entzündungszellen im Transplantat.....	48
5	DISKUSSION.....	51
5.1	Gentransfer bei Keratoplastik.....	51
5.2	Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse.....	52
5.3	Fazit und Ausblick.....	63
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
7	ANHANG.....	75
7.1	Kongressbeiträge/Poster.....	75
7.2	Lebenslauf.....	76
7.3	Danksagung.....	77
7.4	Selbständigkeitserklärung.....	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex-Immunoperoxidase (engl. complex)
ACAID	Vorderkammer-Immunität (engl. anterior chamber associated immune deviation)
Ad	Adenovirus
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
CD	Differenzierungsgruppen von T-Zellen (engl. cluster of differentiation)
CD4+Zelle	T-Zelle, die den CD4-Rezeptor exprimiert, T-Helfer-Zelle
CD8+Zelle	T-Zelle, die den CD8-Rezeptor exprimiert, zytotoxische T-Zelle
CD25+Zelle	T-Zelle, die den CD25-Rezeptor exprimiert, dendritische T-Zelle
CD45+Zelle	T-Zelle, die den CD45-Rezeptor exprimiert, B-Lymphozyt
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary deoxyribonucleic acid)
CMV	Cytomegalievirus
CTLA4-Ig	Cytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes antigen-4-Immunglobulin (engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4-immunoglobuline)
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DTH	Abstoßungsreaktion vom verzögerten Typ (engl. delayed type hypersensitivity)
DZ	Dendritische Zelle
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. enzyme linked immunosorbent assay)
Fab	Antigenbindendes Fragment der Immunglobuline oder Rezeptoren
FasL	Fas-Ligand
Fc	Konstantes Fragment der Immunglobuline oder Rezeptoren
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. fibroblasts growth factor)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. granulocytes/macrophages colony stimulating factor)
HLA	Humanes Leukozytenantigen (engl. human leukocyte antigen)
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL-10	Interleukin-10
kb	Kilobasen
Lew	Lewis-Ratte
LFA-1-Ag	ein Antigen der Lymphozyten (engl. lymphocytes funktion associated Antigen)
LZ	Langerhans-Zelle
LK	Lymphknoten
mAK	Monoklonaler Antikörper
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (engl. major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
μ m	Mikrometer
MP	Makrophage

mRNA	Boten-RNA (engl. messenger ribonucleic acid)
α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphat buffered saline)
pfu	Viruskonzentration (engl. plaque forming unit)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. t-cell-receptor)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (engl. transforming growth factor- β)
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
(T _H 0)	Naive T-Zellen
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
T _{Reg}	Regulatorische T-Zellen
vIL-10	Virales Interleukin-10
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WF	Wistar-Furth-Ratte

ZUSAMMENFASSUNG

Die Hornhauttransplantation ist die häufigste Allotransplantation humanen Gewebes, wobei ihr wegen guter postoperativer Ergebnisse eine Sonderrolle unter den Allotransplantationen eingeräumt wird. Dennoch stellt die immunvermittelte Allograftreaktion, die bei ca. 30% der Patienten auftritt, die häufigste Komplikation nach Keratoplastik dar. Daher steht zunächst der Erhalt des Transplantats im Vordergrund. Bisherige Therapieansätze wiesen häufig systemische Nebenwirkungen auf. Ein innovativer Ansatz ist die Immunmodulation durch das transplantierte Gewebe. Hierbei kann durch Gentransfer eine lokale Überexpression immunmodulatorischer Zytokine erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von viralem Interleukin-10 auf die Immunreaktionen nach Keratoplastik untersucht und folgende Fragestellung bearbeitet: Kann durch das im Transplantat lokal und temporär überexprimierte T_H2 -Zytokin vIL-10 eine Modulation der Immunreaktionen nach Keratoplastik erzielt werden, die ein längeres Transplantatüberleben ermöglicht? Welche Entzündungszellen überwiegen im Transplantat? Welche Entzündungszellen werden durch Interleukin-10 gehemmt? In welchem Teil des Transplantats finden sich Entzündungszellen? Das immunmodulatorische Zytokin vIL-10 wurde mit Hilfe von Adenoviren ex-vivo in korneale Transplantate eingebracht. Nach erfolgreichen in-vitro-Untersuchungen zur Genexpression wurden die transduzierten Hornhäute im Keratoplastikmodell der Ratte transplantiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte allogene Transplantate sowie mit einem Adenoviruskonstrukt ohne therapeutisches Gen transduzierte Hornhäute. Die Tiere wurden nach der Transplantation über 4 Wochen biomikroskopisch nachbeobachtet und die Transplantatüberlebenszeiten verglichen. Die Untersuchung der Tiere zeigte, dass der Einsatz des therapeutischen Gens keine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit bewirkte. Zur immunhistochemischen Darstellung der Immunpathologie wurden die Hornhäute der Ratten zu definierten Zeitpunkten entnommen und mittels ABC- (Avidin-Biotin-Komplex-Immunoperoxidase-) Technik getrennt nach Empfängerbett und Transplantat aufgearbeitet. Die spezifisch angefärbten Zellen wurden statistisch ausgewertet und in den drei Gruppen verglichen. Die Zellzahl stieg an und hatte zum Zeitpunkt der Abstoßung am etwa 17. Tag ihr Maximum. Die größte Gruppe bildeten die Monozyten. Auch CD8⁺-Zellen und NK-Zellen traten gehäuft auf. Ein leichter suppressiver Effekt von vIL-10 war am Tag 10 bei den CD4⁺-Zellen und in schwächerem Maße bei den CD8⁺ sowie bei den Natürlichen Killerzellen sichtbar. Auf die Zahl der Monozyten, Dendritischen T-Zellen und B-Lymphozyten wies vIL-10 keinen Einfluss auf. Weiterhin zeigte sich, dass sich am Tag 10 in allen Gruppen die meisten Zellen in der Empfängerkornea befanden,

wohingegen sich am Tag 17 die meisten Zellen im Übergangsbereich nachweisen ließen. Am Tag 24 schließlich waren die Entzündungszellen in das Transplantat immigriert und das Transplantat wurde als abgestoßen betrachtet. Die Immunhistologie bestätigte, dass der lokale adenovirale Gentransfer in die Korneae nicht zur gewünschten Immunmodulation führte.

Diese Arbeit liefert Hinweise darauf, dass der lokale Gentransfer von vIL-10 möglich ist, in der Keratoplastik in dieser Form allerdings keine immunsuppressive Wirkung zeigt. Dennoch scheint der Gentransfer grundsätzlich eine Möglichkeit in der Abstoßungsprävention zu sein und muss in weiteren Arbeiten untersucht, variiert und optimiert werden.

1 EINLEITUNG

1.1 Die Kornea

Die glasklare und stark gewölbte Kornea ist gleichsam einem Uhrglas in die Sklera eingefügt. Sie hat einen Durchmesser von 11,5 mm und ist im Zentrum dünner (ca. 550 μm) als am Limbus (ca. 1000 μm).

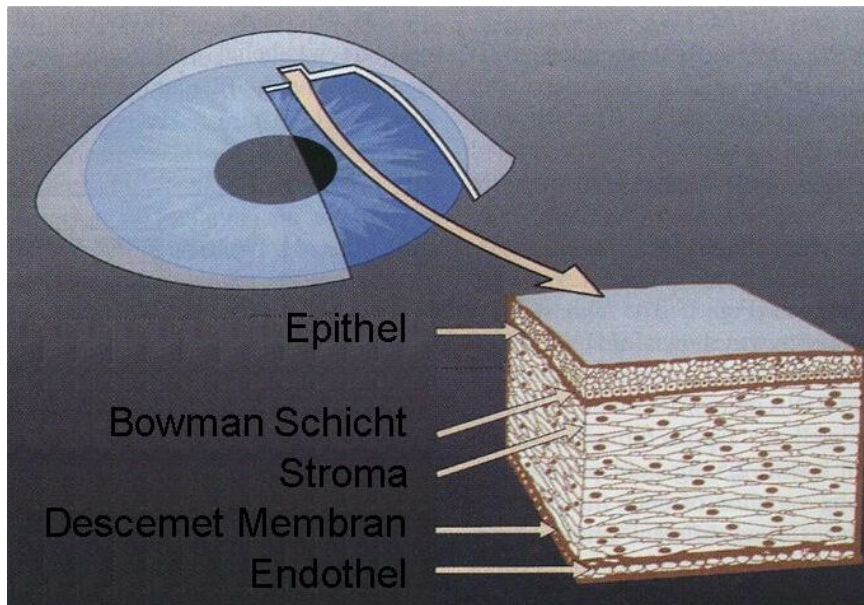


Abb.1: Schematischer Aufbau der humanen Kornea (aus Wolff's Anatomy, 8th Edition, 1997).

Die Kornea weist von außen nach innen folgende 5 Schichten auf (siehe Abb. 1):

1. Das 70 μm starke Epithel nimmt etwa 10% der Hornhautdicke ein und besteht aus der Basallamina, den Basal-, Stachel-, Intermediär- und den Superfizialzellen. Es besitzt eine hohe Regenerationsfähigkeit.
2. Unter dem Epithel befindet sich die 8 bis 14 μm dicke Lamina limitans anterior, die Bowmansche Grenzschicht. Sie besteht aus feinen Kollagenfibrillen und ist im Gegensatz zum Epithel nicht regenerationsfähig.
3. Die Substantia propria, das Stroma, ist ein modifiziertes Bindegewebe und bildet etwa 90% der Hornhautdicke. Sie besteht aus oberflächenparallelen Kollagenfibrillen, die u.a. Hyaluronsäuresulfat enthalten. Die Zwischenräume füllt die aus Muko- und Glykoproteinen bestehende Grundsubstanz aus. Vereinzelt sind Keratozyten enthalten.
4. Die Lamina limitans posterior, die Descemetmembran, besteht aus gitternetzartig angeordneten Kollagenfibrillen und stellt ein Produkt des Hornhautendothels dar.

5. Das Endothel besteht aus einer 5 bis 6 μm dicken, einschichtigen Lage platter Bindegewebszellen und grenzt die Hornhaut gegen die vordere Augenkammer ab. Es ist praktisch nicht regenerationsfähig.

Die Kornea ist avaskulär, transparent und lichtbrechend — letzteres erfolgt durch den Eintritt der Lichtstrahlen in das feste Medium und durch die Korneawölbung. Mit 40 bis 45 Dioptrien besitzt die Kornea den größten Teil der Gesamtbrechkraft des Auges. Das Korneaepithel schützt das Auge als mechanisch stabile und chemisch impermeable Barriere gegen Umwelteinflüsse und regelt den Stoffaustausch der Kornea. Zahlreiche sensible Nervenendigungen des Nervus ciliaris signalisieren Fremdkörper und Verletzungen dieser am dichtesten sensibel innervierten Struktur des Körpers. Die stromalen Kollagenfibrillen geben der Kornea ihre Stabilität. Die Ernährung erfolgt durch Diffusion aus Kammerwasser und Tränenfilm.

Die Transparenz der Hornhaut lässt sich durch die Avaskularität, die regelmäßige Anordnung der Fibrillen und den geringen Wassergehalt des Stromas erklären. Das Endothel beschränkt passiv durch Zonulae occludentes den Einstrom von Kammerwasser und fördert aktiv die Diffusion von Wasser in die Vorderkammer durch Aufrechterhaltung eines Gefälles gelöster Teilchen mithilfe ATP-betriebener Ionenpumpen.

Das Endothel stellt eine empfindliche Zellschicht mit geringer regenerativer Kapazität dar. Im Gegensatz zu vaskulären Endothelzellen, die eine rasche Zellteilung aufweisen, werden Endothelzellverluste der Kornea primär durch Vergrößerung der umliegenden Zellen kompensiert. Hierdurch wird das Eindringen von Kammerwasser ins Stroma verhindert und so seine Transparenz aufrechterhalten (Joyce, 2003). Endothelzellen besitzen außerdem die Fähigkeit, in Bereiche von Zellverlusten einzuwandern. Dies wird z.B. während des postnatalen Wachstums der Kornea, durch normalen alterungsbedingten Zellverlust und nach intraokulären Traumata erforderlich. Zudem stellt die Fehlfunktion dieser Zellschicht einen Hauptgrund für die Notwendigkeit kornealer Transplantationen dar. Klinisch können das Glaukom oder endotheliale Dystrophien ursächlich für eine Endotheldekompensation sein. Darüber hinaus ist das Hornhautendothel die Zielstruktur akut und chronisch verlaufender Immunreaktionen, die für Transplantatverluste verantwortlich sind.

1.2 Die Keratoplastik

Die Hornhauttransplantation (Keratoplastik) ist nicht nur die erste erfolgreich durchgeführte Transplantation gewesen, sondern sie stellt auch die häufigste Übertragung humanen Gewebes dar, in den USA beispielsweise ca. 50 000/Jahr (Eye Bank Association of America, 2002). Bei einer weltweiten Prävalenz von 38 Millionen Erblindungen ist etwa jede vierte auf Hornhauttrübungen zurückzuführen (Thylefors et al., 1995). Da es bisher nicht gelungen ist, einen funktionellen Ersatz zu entwickeln, stellt derzeit die allogene Korneatransplantation die einzige Therapieoption dar.

1.2.1 Abstoßungsreaktionen nach Keratoplastik

Trotz intensiver immunmodulatorischer Therapie ist mit Abstoßungsraten von circa 10%, bei Risikopatienten von bis zu 60% der Transplantate zu rechnen (Sundmacher, 1977 und 1983; Thiel und Manthey, 1980; Alldredge et Krachmer, 1981; Pleyer et al, 1990). Diese sehr unterschiedlichen Angaben können als Ausdruck eines ausgesprochen heterogenen Patientengutes mit unterschiedlichen Risikofaktoren und als Ausdruck unterschiedlicher Wertung der verschiedenen Reaktionsformen aufgefasst werden (Alldredge et Krachmer, 1981). Zu diesen Risikofaktoren zählen die präoperative Hornhautvaskularisation, Endotheldysfunktionen, erbliche Stromadystrophien, Verätzungen, Verbrennungen (Thiel et Manthey, 1980), sowie die Re-Keratoplastik und Eingriffe aus akuter Indikation (Keratoplastik à chaud). Als ungünstige Faktoren gelten ebenso große und limbusnahe Transplantate und genetisch bedingte Gewebeunverträglichkeiten. Jonas et al. (2002) hingegen arbeiteten in einer retrospektiven Studie einzig die Fadenlockerung und die prä- oder postoperative Korneavaskularisation als Risikofaktoren heraus. Diesen Untersuchungen zufolge haben Transplantatdurchmesser, sowie Alter und Geschlecht des Empfängers keinen Einfluss auf das Transplantationsergebnis. Das grundlegende Verständnis der Transplantatabstoßung als immunologischer Prozess wurde bereits früh entwickelt. Seit den Untersuchungen Medawars ist die Transplantatabstoßung als spezifische Reaktion einer Gewebeunverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger bereits lange bekannt (Medawar, 1944).

In den meisten Fällen handelt es sich um eine frühe, akute Transplantatabstoßung (Jonas et al., 2002). In dieser Studie fanden 74% der Abstoßungsreaktionen innerhalb der ersten 2,5 Jahre, und 13% erst nach mehr als 4 Jahren statt.

Die Transplantatabstoßung kann die drei wesentlichen morphologischen Strukturen der Hornhaut betreffen und isoliert an Epithel (siehe Abb. 2), Stroma und Endothel beobachtet werden (Larkin, 1994).

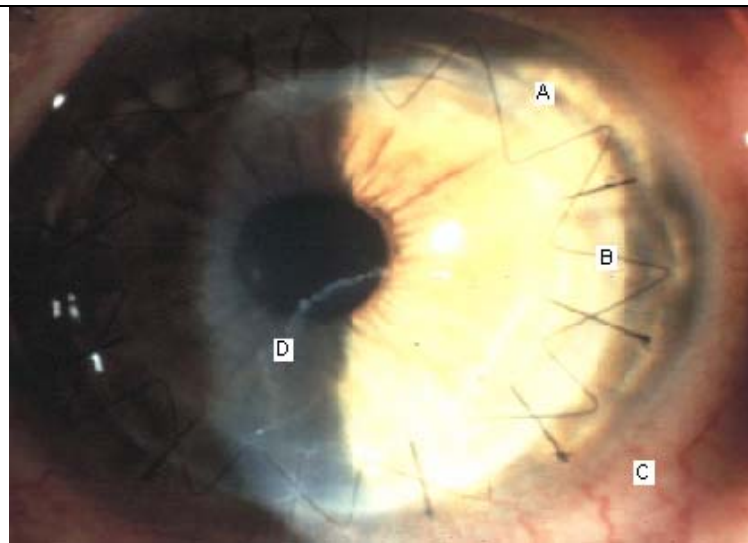


Abb. 2: Abstoßungsreaktion am Epithel nach perforierender Keratoplastik im menschlichen Auge

A = Übergang zwischen Empfänger- und Spenderkornea,
 B = fortlaufende Naht,
 C = konjunktivale Injektion,
 D = Epithelverlust durch Abstoßungsreaktion, epitheliale Abstoßungslinie

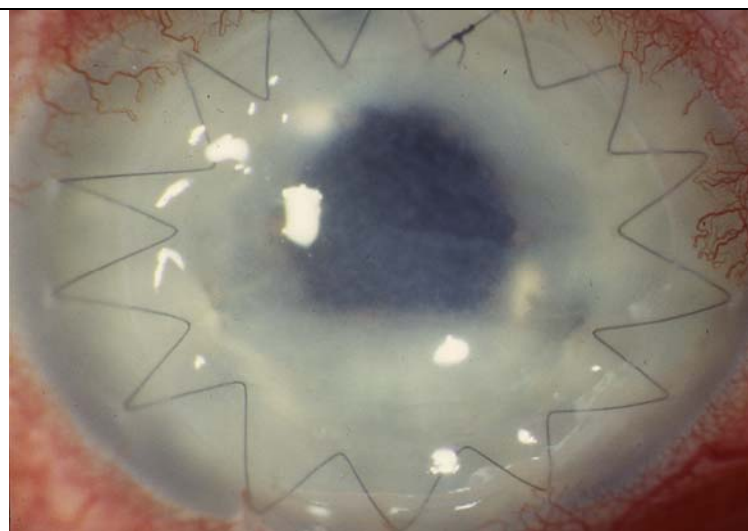


Abb. 3: Abstoßungsreaktion am Stroma nach perforierender Keratoplastik im menschlichen Auge

Die Abstoßungsreaktion im Stroma äußert sich durch ein ausgeprägtes Stromaödem, was eine Korneatrübung bedingt. Blutgefäße der Bindehaut wachsen in die Kornea vor.

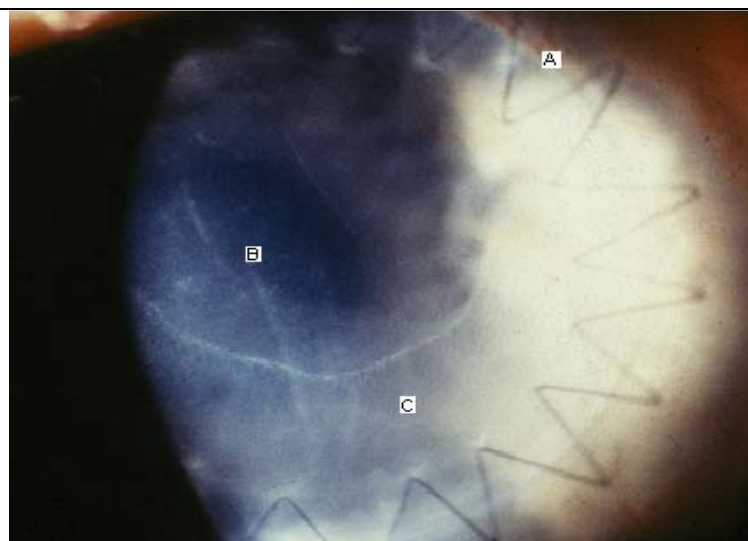


Abb. 4: Abstoßungsreaktion am Endothel nach perforierender Keratoplastik im menschlichen Auge

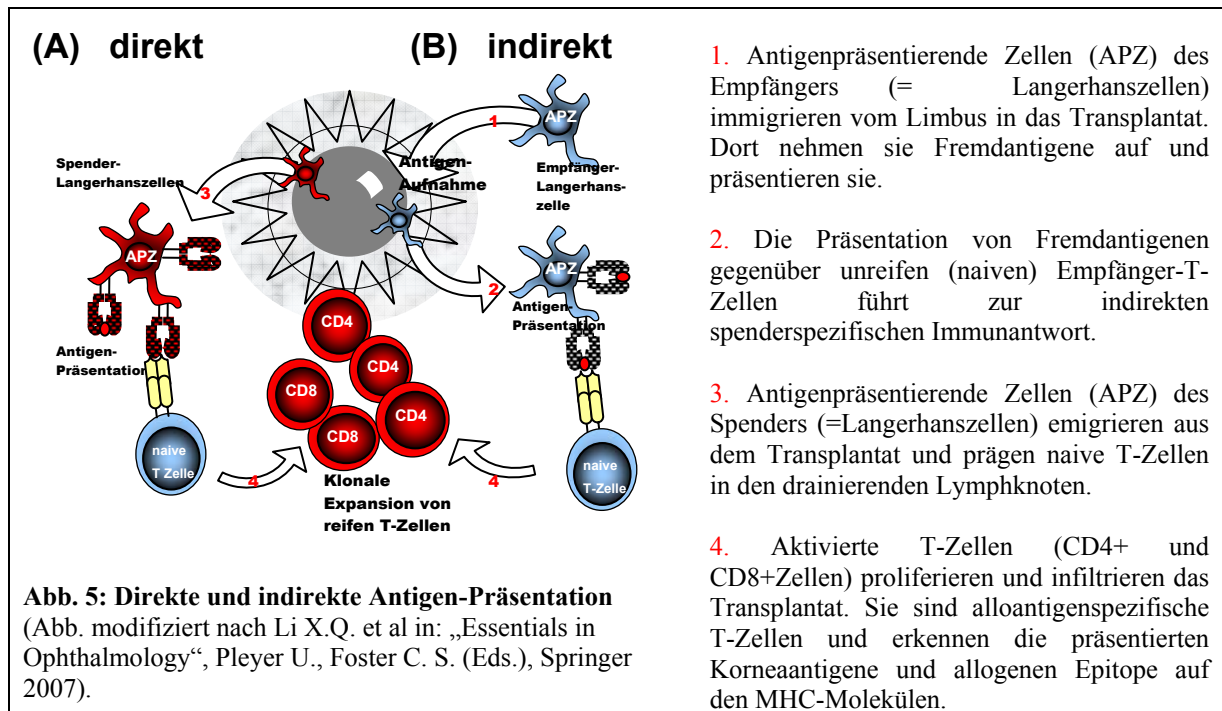
A = Übergang zwischen Empfänger- und Spenderkornea,
 B = Descemetfalten, Zellbeslag am Endothel mit neutrophilen Leukozyten, Lymphozyten und reduzierter Endothelzellichte
 C = endotheliale Abstoßungslinie, sog. Khodadoust-Linie

(eigene Fotografien)

Das Epithel an der Außenseite der Kornea verfügt jedoch über eine gute Regenerationsfähigkeit und kann so von Empfängerzellen ersetzt werden. Bei der stromalen Rejektion kommt es zur Einwanderung von Leukozyten in das korneale Stroma, was zu Ödem und Trübung führt (siehe Abb. 3). Diese Form der Abstoßung ist jedoch nur sehr selten zu beobachten. Aus diesem Grund spielen epitheliale und stromale Rejektionen klinisch nur eine untergeordnete Rolle (Larkin, 1994). Die häufigere und funktionell wichtigere Form der kornealen Transplantatabstoßung findet am Endothel statt (siehe Abb. 4). In diesem Fall gelangen Leukozyten vermutlich durch die Vorderkammer zur Endothelzellschicht und zerstören sie. Da das Endothel keine replikationsfähige Zellschicht ist, können diese Schäden nur in begrenztem Maße durch Einwanderung und Vergrößerung überlebender Endothelzellen ausgeglichen werden. Wird dabei eine kritische Zellzahl unterschritten, führt dies nach Verlust der Hydratationskontrolle zu einer Quellung und Trübung des Transplantats. Die Endothelabstoßung kündigt sich mit ziliarer Injektion, Lakrimation und Visusminderung an. Spaltlampenmikroskopisch zeigen sich ein Vorderkammerreizzustand, Endothelpräzipitate und gegebenenfalls Neovaskularisationen. Unter Umständen sieht man eine Endothellinie, die sich vom Rand nach zentral ausbreitende Khodadoust-Linie, die pathognomonische Bedeutung besitzt. Die Reaktion kann sich langsam und schleichend entwickeln oder den Charakter eines akuten Schubs haben und mit einem Hypopyon kombiniert sein (Thiel et Manthey, 1980).

Die Erfolgsaussichten bei Transplantationen steigen, je genauer Spender und Empfänger genetisch übereinstimmen. Dies betrifft Merkmale wie die MHC-Allele. Der Begriff MHC (major histocompatibility complex) bezeichnet allgemein eine Gruppe von Genen, die Zelloberflächenmoleküle zur Zell-Zell-Erkennung kodieren. Beim Menschen werden sie als HLA (human leukocyte antigen) bezeichnet. Die MHC-Moleküle sind verantwortlich für die Histokompatibilität, das heißt für die Verträglichkeit von Gewebe- und Organtransplantaten. Die Funktion der MHC-Moleküle besteht prinzipiell darin, eigene und fremde Peptide aus extrazellulären oder aus zytosolischen Proteinen zu binden und für die Erkennung durch T-Lymphozyten auf der Zelloberfläche zu präsentieren. So gibt es drei Klassen von MHC-Molekülen, die sich in ihrer Funktion und Struktur unterscheiden. Bei der Transplantatabstoßung sind jedoch zwei Gruppen von Bedeutung: Die MHC-Klasse-I-Moleküle findet man auf nahezu allen kernhaltigen Zellen. Sie zeichnen die Zellen als „körpereigen“ aus. Die MHC-Klasse-II-Moleküle werden hingegen vornehmlich von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. B-Lymphozyten, Makrophagen,

Dendritischen Zellen und Thymus-Epithelzellen exprimiert. Auf diese Weise werden körperfremde Antigene präsentiert (siehe Abb. 5) und angegriffen.



In der Kornea sind sehr wenige MHC-II-Molekül-positive Dendritische Langerhanszellen vorhanden. Die transplantierte Kornea infiltrieren sie jedoch schnell (siehe Abb. 6). Durch Strategien, die ein Einwandern von Dendritischen Zellen und Makrophagen des Empfängers in das Transplantat verhindern, konnten Erfolge beim Transplantatüberleben erzielt werden (Dana et al., 1997; Slegers et al., 2000 und 2003).

Bei experimenteller Keratoplastik an Maus, Ratte und Kaninchen wurden die immunologischen Mechanismen, die der Abstoßung kornealer Transplantate zugrunde liegen, untersucht. Bei der akuten Transplantatabstoßung sind T-Lymphozyten entscheidend an den immunpathologischen Effektormechanismen beteiligt (Callanan et al., 1988; Niederkorn, 1999; Pleyer et al., 1995; Wackenheim-Urlacher et al., 1995). Unreife oder naive T-Zellen (T_H0) müssen geprägt und aktiviert werden; sie entwickeln CD-Moleküle an der Zelloberfläche. Dies erfolgt durch Antigenpräsentation (siehe Abb. 5). Bei der T-Zell-Reifung werden zwei T-Zell-Populationen generiert: Die T-Helfer-Zellpopulation (T_H) trägt das CD4-Antigen – es ist wichtig für die Bindung an MHC-II-Moleküle. Die zytotoxische T-Zellpopulation hingegen exprimiert das CD8-Antigen, das für die Bindung an MHC-I-Moleküle zuständig ist und auch von NK-Zellen getragen wird. Das CD1-Antigen wird beispielsweise von Dendritischen Zellen exprimiert und dient der Antigenpräsentation. Das CD2-Molekül wird von allen T-Zellen sowie Natürlichen Killerzellen exprimiert und dient

der indirekten Aktivierung sowie der Bindung des LFA-1-Antigens (lymphozytenfunktionsassoziiertes Antigen). Die CD3-Moleküle sind eng mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert und bedeutsam für die Signaltransduktion und T-Zell-Aktivierung. Ein wichtiges ko-stimulatorisches Signal für die T-Zellaktivierung und -Proliferation liefert die Interaktion des CD28-Moleküls mit den Molekülen CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen (siehe Abb. 6.B). Nach Antigenkontakt gibt es eine weitere vom vorherrschenden Zytokinmilieu bestimmte funktionelle Differenzierung der T_H0 -Zelle in zwei T-Zell-Subpopulationen: die T_H1 und T_H2 -Zellen (siehe Abb. 6). Die T_H1 -Zellen sezernieren Interleukin-2, $IFN-\gamma$, $TNF-\beta$ sowie GM-CSF und führen über Makrophagenaktivierung zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen. T_H2 -Zellen sezernieren vor allem Interleukin-4, -5 und -10, daneben Interleukin-3, -6, -7, -8, -9, -14 und aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern. Beide T_H -Gruppen sind in der Lage, durch die eigenen Zytokine die jeweils andere Zellgruppe zu inhibieren und die eigene positiv zu verstärken.

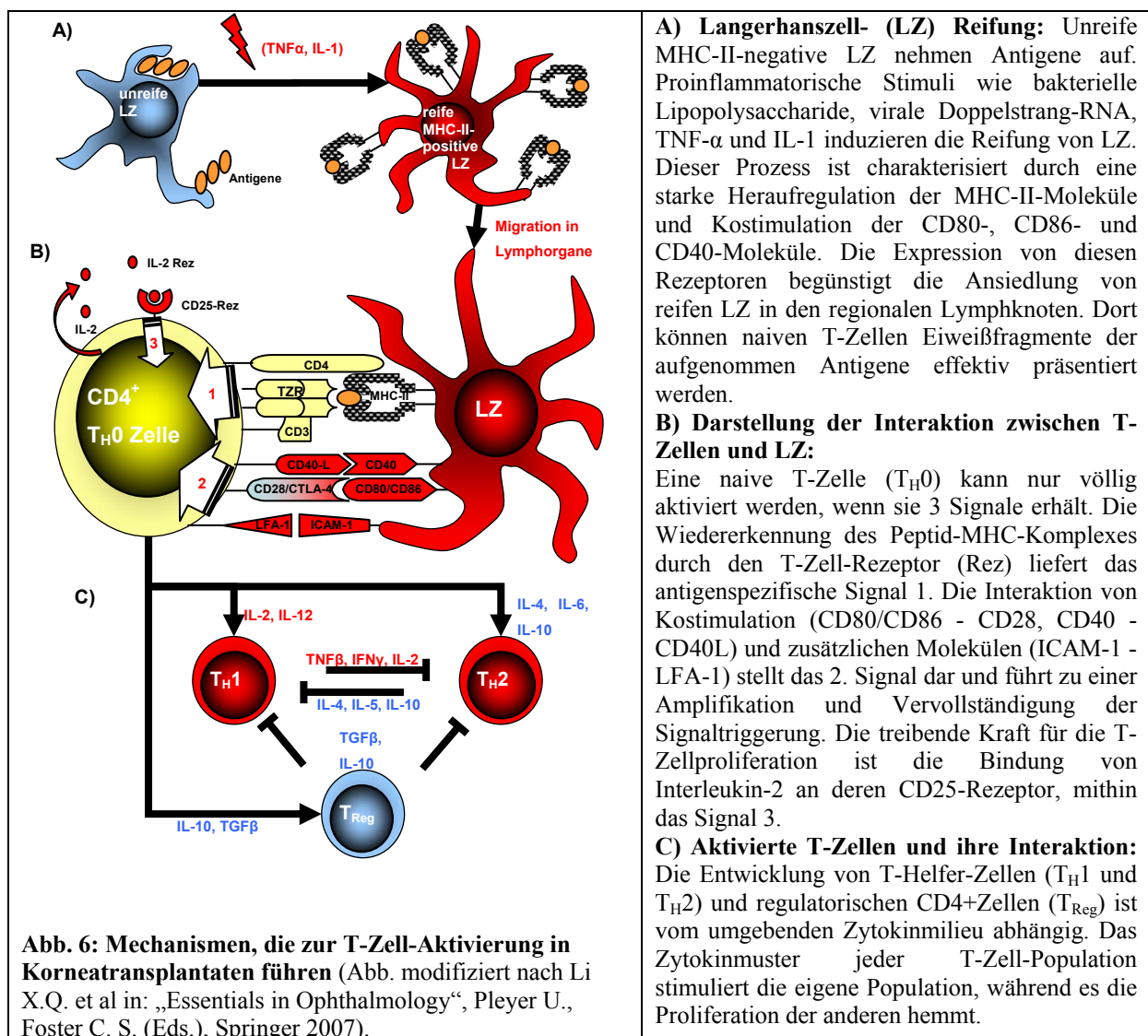


Abb. 6: Mechanismen, die zur T-Zell-Aktivierung in Korneatransplantaten führen (Abb. modifiziert nach Li X.Q. et al in: „Essentials in Ophthalmology“, Pleyer U., Foster C. S. (Eds.), Springer 2007).

Bereits in der frühen afferenten Phase der Immunreaktion können Makrophagen und T-Lymphozyten im Transplantat nachgewiesen werden (Holland et al., 1991; Nishi et al., 1990). Anschließend kommt es zur Proliferation immunkompetenter Zellen. Die von diesen Zellen freigesetzten Zytokine fördern den Prozess. Proinflammatorische Zytokine (IFN- γ , Interleukin-2, TNF- α) spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der akuten Transplantatabstoßung. Dies konnte sowohl im Transplantat als auch im Kammerwasser nachgewiesen werden. Schließlich erfolgt die Infiltration und Zerstörung des Transplantats (Pleyer et al., 1998). Zu den im Kammerwasser nachweisbaren Entzündungszellen gehören auch die Natürlichen Killerzellen. Möglicherweise spielen auch diese Zellen als Effektoren beim Abstoßungsprozess im efferenten Stadium eine Rolle (Claerhout et al., 2004). Natürliche Killerzellen stellen 10% der Blutlymphozyten dar und vernichten „körperfremde“, virusinfizierte und Tumorzellen ohne vorherige Immunisierung durch verschiedene Mechanismen. Sie sekretieren Perforin, das durch Porenbildung die Zielzelle zerstört. Sie können auch Zielzellen, an die Antikörper gebunden haben, töten, indem sie durch Bindung an den Fc-Rezeptor das zytolytische Programm aktivieren. Eine dritte Möglichkeit besteht in der Bindung des Fas-Liganden der Natürlichen Killerzellen an den CD95-Rezeptor der Zielzelle. Dies löst Apoptose, den programmierten Zelltod, aus.

1.2.2 Das Vorderkammer-Immunprivileg

Hornhauttransplantationen können auch ohne systemische Immunsuppression oder MHC-Übereinstimmung erfolgreich verlaufen. Dafür wird das Immunprivileg von Vorderkammer und Kornea verantwortlich gemacht (Nieder Korn, 1999). Jedes übertragene Fremdgewebe löst normalerweise im Empfänger eine immunologische Reaktion aus. Dass diese in der Hornhaut nach Transplantation ausbleiben kann, wird auf die besondere Situation in der Kornea als immunologisch „privilegiertem Ort“ zurückgeführt. Das bedeutet, dass Spendergewebe vom Empfängerorganismus nicht unbedingt als „fremd“ erkannt wird und sogar immunsuppressive Mechanismen aktiviert werden. Damit bleibt die Abstoßungsreaktion aus. Dieser Effekt wird auch als Vorderkammerprivileg oder ACAID (engl. anterior-chamber-associated immune deviation) bezeichnet (Nieder Korn, 1999) (siehe Abb. 7.A).

Für das Immunprivileg ist eine Reihe von spezifischen morphologischen und funktionellen Besonderheiten verantwortlich, die bereits 1948 von Medawar vermutet wurden.

- die Avaskularität der Wirtskornea,
- das Fehlen von sensibilisierendem Antigen im Transplantat,
- der rasche Ersatz des Spenderepithels durch den Empfänger,

- die schwache lymphatische Drainage,
- die geringere Menge an MHC-II+ antigenpräsentierenden Zellen in der zentralen Kornea, beispielsweise Dendritische Zellen (Nieder Korn, 1999),
- das Fehlen einer lokalen Antikörperproduktion.

Es erfolgt eine Antigenpräsentation über den efferenten Schenkel, wodurch die regulatorischen T-Zellen die T_H1 - und T_H2 -Immunantwort hemmen (siehe Abb. 7.B rechts).

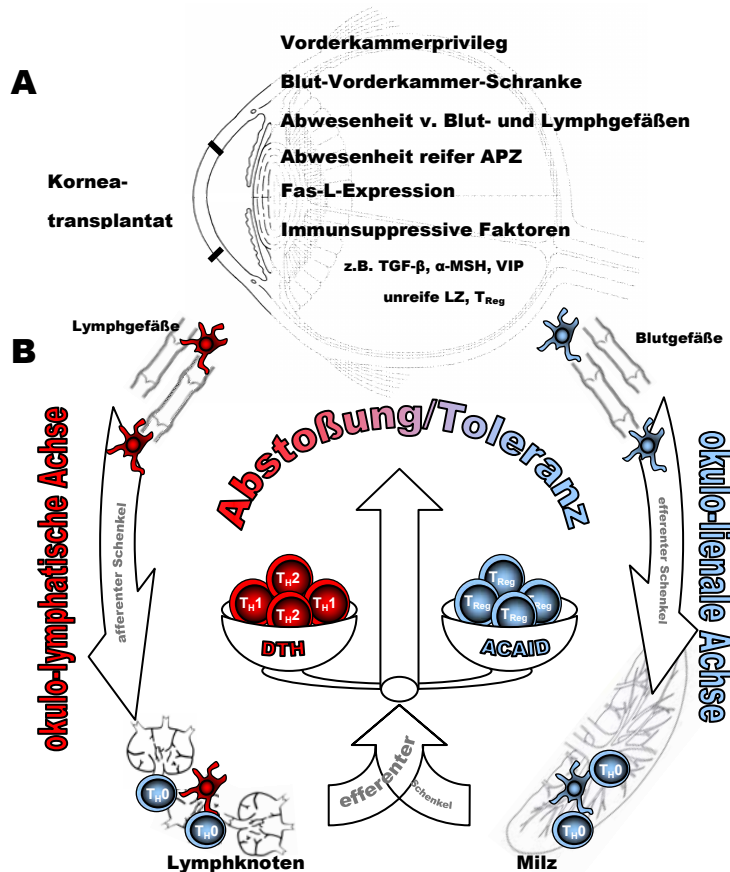


Abb. 7: Immuntoleranz versus Abstoßungsreaktion (Abb. modifiziert nach Li X.Q. et al in: „Essentials in Ophthalmology“, Pleyer U., Foster C. S. (Eds.), Springer 2007).

A) Lokale Faktoren bedingen das Vorderkammerprivileg:

Abkürzungen: APZ = antigenpräsentierende Zellen, FasL = Fas-Ligand, TGF- β = tumor growth faktor- β , α -MSH = α -Melanozyten-stimulierendes Hormon, VIP = vasoaktives intestinales Peptid, LZ = Langerhanszellen, T_{Reg} = regulatorische T-Zellen.

B) Vereinfachtes Schema der Immunregulation von Korneatransplantaten:

Das in die Vorderkammer eingebrachte Ag wird von APZ aufgenommen und in die Lymphorgane transportiert. In experimentellen Modellen wird den naiven T-Zellen (T_H0) das Ag via okulo-lymphatischer Achse präsentiert, was zu einer Abstoßungsreaktion vom verzögerten Typ (delayed type hypersensitivity = DTH) führen kann. Die APZ hingegen kann via okulo-lenaler Achse eine von T_{Reg} getriggerte down-Regulation der T_H1 - und T_H2 -Immunantwort induzieren und somit das Vorderkammerprivileg (ACAID) fördern.

Zu aktiver Suppression und Veränderung der Immunantwort in der Kornea kommt es auch durch die Expression des Fas-Liganden (Fas-L) auf kornealen Endothelzellen. In aktivierten Lymphozyten, die den Fas-L exprimieren und mit solchen Endothelzellen interagieren, wird Apoptose, der programmierte Zelltod, induziert (Griffith et al., 1995; Stuart et al., 1997; Yamagami et al., 1997). Das Vorderkammer-Immunprivileg ist jedoch als ein relativer und nicht als absoluter Schutzmechanismus zu betrachten (Williams et Coster, 1997). So ist es dennoch möglich, dass sich Immunreaktionen entwickeln, die im Langzeitverlauf zu einer Transplantatabstoßungsrate von 30% führen können (Alldredge et Krachmer, 1981; Pleyer et al., 1992; Reinhard et al., 1997). Eine T_H1 - und T_H2 - Immunantwort kann ausgelöst werden, wenn eine Antigenpräsentation auf dem afferenten Schenkel erfolgt, bei der unreife T-Zellen geprägt und aktiviert werden, was in eine Abstoßungsreaktion vom verzögerten Typ münden kann (siehe Abb. 7.B links).

Zudem weisen Patienten mit Risikofaktoren eine ungünstigere Prognose für das Transplantatüberleben auf, sodass sich hier der Anteil der Transplantatverluste durch Immunreaktionen auf 60% erhöhen kann (Stübiger et al., 1995; Sanfilippo et al., 1986, Thiel et Manthey, 1980). Solche Risikofaktoren sind eine vaskularisierte Empfängerhornhaut, ein limbusnahes Transplantat, mehr als drei Transplantate an einem Auge oder vier Transplantate beidseits und ein ausgeprägt trockenes Auge.

Neben der Transplantatabstoßung stellt sich das Problem des Mangels an geeigneten Spenderhornhäuten. Dieser ist zum einen durch Endothelzellverlust während der Langzeitlagerung bedingt, der Korneae für eine Transplantation unbrauchbar machen kann, zum anderen durch die geringe Zahl an Spendern. Ferner wirken sich nach Transplantation auftretende Endothelzellverluste ungünstig auf die Prognose aus. Im postoperativen Verlauf stellen akute und vermutlich auch chronische Immunreaktionen ernste Komplikationen dar. Aus diesen Gründen ist unter Berücksichtigung neuer Erkenntnisse über den Verlauf dieser Reaktionen die Entwicklung neuer Ansätze in der Prävention von Immunreaktionen nach Keratoplastik notwendig.

1.3 Prävention der Immunreaktionen nach Keratoplastik

Zurzeit gibt es zwei wesentliche klinische Vorgehensweisen zur Prävention der Immunreaktionen:

- 1) Die Minimierung der Antigendifferenz von Spender und Empfänger wird durch die Prüfung der Histokompatibilität erreicht (Matching). Dies wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen intensiv untersucht und erbrachte insbesondere zur MHC-Klasse-II

Antigendifferenz sehr unterschiedliche Einschätzungen, die eine abschließende Beurteilung derzeit noch nicht zulassen (Gore et al., 1995; Vail et al., 1994; Sanfilippo et al., 1986, Reinhard et al., 2004).

- 2) Die immunmodulatorische Therapie dient ebenfalls der Abstoßungsprävention (siehe Abb.8). Sie wird in der klinischen Praxis als weiterer und zurzeit entscheidender präventiver Ansatz angewendet (Rinne et Stulting, 1992),

Hier sind die Erfahrungen aus der Behandlung von Transplantationen solider Organe eingeflossen. So ist durch die Einführung von immunmodulatorisch wirksamen Pharmaka wie Cyclosporin A, FK 506 und Mycophenolat Mofetil, Tacrolimus und monoklonale Antikörper ein wichtiger Beitrag zur Therapie nach Korneatransplantation geleistet worden (Pleyer et al., 1998). Allerdings sind auch unter Verwendung dieser systemisch angewendeten Maßnahmen Abstoßungsreaktionen zu beobachten. Es darf dabei jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die oben genannten systemischen pharmakologischen Therapien oft erhebliche Nebenwirkungen aufweisen. Ungleich verträglicher und nebenwirkungsärmer sind die lokal anwendbaren Medikamente.

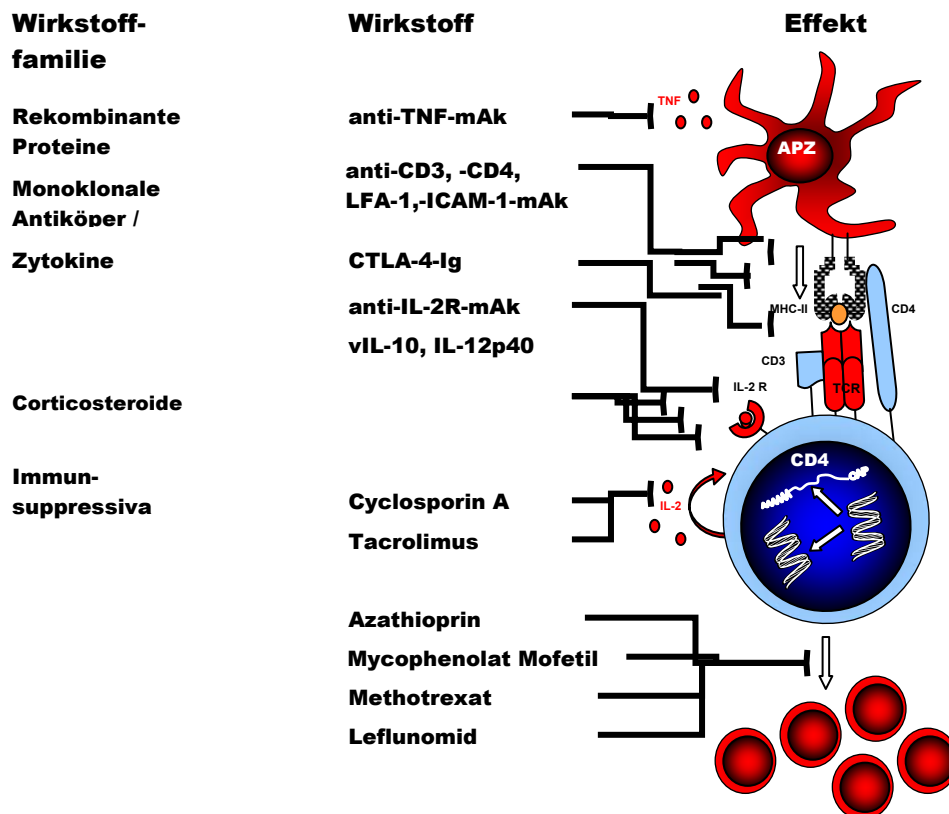


Abb. 8: Immunomodulatorische Wirkstoffe für die Behandlung nach Keratoplastik.

Dieses Schema zeigt zum einen die Angriffspunkte der klinisch gebräuchlichen Wirkstoffe wie Corticosteroide, immunsuppressive und antiproliferatorische Medikamente sowie zum anderen neue, experimentelle Ansätze wie rekombinante Proteine, monoklonale Antikörper und Zytokine. (Abb. modifiziert nach Li X.Q. et al in: „Essentials in Ophthalmology“, Pleyer U., Foster C. S. (Eds.), Springer 2007).

1.3.1 Neue Ansätze zur Prävention der Abstoßungsreaktionen kornealer Transplantate

Der Endothelzellverlust, der im Zusammenhang mit Hornhauttransplantationen auftritt, ist bedingt durch die Explantation (traumatisch), die ex-vivo-Lagerung des Transplantates (zeitabhängig), den chirurgischen Eingriff selbst und die immunologischen Prozesse (Gain et al., 2001). Neue Ansätze zur Verbesserung der Endothelvitalität vor Transplantation befassen sich mit dem Einsatz von Wachstumsfaktoren zur Optimierung der Lagerungsbedingungen des Transplantats (Rieck et al., 2003). Dies beinhaltet auch die genetische Modifizierung von kornealen Endothelzellen durch zytoprotektive oder antiapoptotische Gene, die einen Schutz dieser Zellen bei der Lagerung und der Allotransplantation vermitteln können. Andere aktuelle Ansätze befassen sich mit der Transplantation von Endothelzellen oder Stammzellen (Aboalchamat et al., 1999; Engelmann et al., 1999).

1.3.2 Gentherapie zur Modulation des kornealen Endothels

Die anatomischen und immunologischen Besonderheiten der Kornea erlauben eine Immunmodulation durch genetische Manipulationen, wobei sich vor allem das Endothel sowohl mit viralen als auch mit nichtviralen Vektoren transfizieren lässt (Larkin et al., 1996). Gründe, die die Kornea so attraktiv für Versuche mit Gentherapie zur Immunmodulation machen, sind

- die anatomisch bedingte gute Zugänglichkeit,
- die Möglichkeit der ex-vivo-Lagerung über Wochen,
- eine gute Transfizierbarkeit/Transduzierbarkeit des Endothels,
- immunologische Eigenheiten wie das Vorderkammerprivileg,
- die Möglichkeit der nicht-invasiven Untersuchung nach Transplantation.

Ein gezielter Transfer des therapeutischen Gens in die Zielzellen ist durch die ex-vivo-Kultivierung der Kornea möglich. Ein Vorteil dieser Anwendung liegt in der Vermeidung der systemischen Applikation des Vektors. Darüber hinaus ist die Beurteilung des Behandlungserfolgs ohne zusätzlichen operativen Eingriff möglich. Als Gentransfervehikel kommen vor allem Adenoviren und Lipide zum Einsatz.

1.3.3 Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren

Virale Vektoren besitzen sehr effiziente Mechanismen zum Einschleusen von DNA in die Wirtszellen und werden durch Ausschaltung ihrer pathogenen Eigenschaften für die gefahrlose Anwendung am Menschen nutzbar gemacht. Allerdings induzieren sie oft eine

Immunantwort gegen ihre viralen Bestandteile, sodass eine langfristige Expression der übertragenen Gene nicht immer möglich ist (Olive et al., 2002; Ritter et al., 2002; Verma et Somia, 1997).

Häufig eingesetzte virale Vektoren sind Adenoviren. Es werden aber auch Retro- und Lentiviren verwendet.

Adenoviren enthalten eine lineare Doppelstrang-DNA mit einer Größe von 36 bis 38 Kilobasen. Der adenovirale Infektionszyklus umfasst mehrere Schritte. Zunächst erfolgt die Adsorption des Viruspartikels an Zelloberflächen-Rezeptoren. Die Aufnahme der Virus-Rezeptor-Komplexe in das Zytoplasma der Wirtszelle erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose. Dann werden die Viren aus den endozytotischen Vesikeln entlassen und gelangen durch Bindung an Mikrotubuli zu den Kernporen. Der virale DNA-Protein-Komplex wird nach dem Kapsidabbau freigesetzt und in den Nukleus aufgenommen. Das Adenovirusgenom integriert nicht in das Wirtsgenom, sondern liegt als episomale Einheit im Zellkern vor (Horwitz, 1990). Nun beginnt die Wirtszelle mit der Expression des eingeführten Transgens, in unserem Fall Interleukin-10.

1.3.4 Vor- und Nachteile adenoviraler Vektoren

Adenovirale Vektoren bieten gegenüber anderen Gentransfervehikeln eine Reihe von Vorteilen. Im Gegensatz zu retroviralen Vektoren können sie sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen transduzieren. Um adenovirale Vektoren relativ gefahrlos handhaben zu können, ist es üblich, ihr Genom derart zu manipulieren, dass diese rekombinanten Adenoviren zwar zur Transduktion, jedoch nicht mehr zur Replikation fähig sind und sich somit nicht unkontrolliert vermehren können (Kolls et al., 1994). Der wesentliche Nachteil adenoviraler Vektoren liegt in der Immunantwort, die sie im Wirt induzieren können. Dadurch ist die Expression des eingeführten Transgens nur temporär und endet nach etwa 3-4 Wochen.

1.3.5 Modulation der immunvermittelten Transplantatabstoßung

Zytokine sind lösliche Mediatoren, die eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten spielen. CD4+T-Zellen werden nach ihrer Zytokinsekretion in T_H1- und T_H2-Zellen unterteilt. Das Überwiegen der T_H1- oder T_H2-Antwort kann Einfluss auf den Verlauf von Transplantationen nehmen. So gibt es Studien, die belegen, dass eine erhöhte Produktion von T_H2-Zytokinen mit einem besseren Transplantatüberleben einhergeht. Der Einsatz von IL-4 ermöglichte ein verlängertes Überleben in Haut-, Nieren- und Herztransplantationsmodellen (Mottram et al., 1995, Takeuchi et al., 1997, He et al., 1998).

Dabei führte sowohl die lokale Überexpression, als auch eine systemische Applikation von IL-4 zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens (Takeuchi et al., 1997, He et al., 1998). Eine Transplantatabstoßung dagegen ist eng mit der Expression von T_H1-Zytokinen verbunden, während T_H2-Zytokine dort nur in geringen Mengen oder gar nicht gefunden werden (Dallman et al., 1991). Bei der Abstoßung kornealer Transplantate handelt es sich nach Qian et Dana um einen CD4+T_H1-vermittelten Prozess (Qian and Dana, 2001). In-vivo führt die Depletion von CD4+T-Zellen mithilfe monoklonaler Antikörper zu einem verlängerten Transplantatüberleben (Coupland et al., 1995; He et al., 1991; Pleyer et al., 1995). Überdies zeigen Mäuse mit ausgeschaltetem CD4-Gen eine verminderte korneale Transplantatabstoßung. Im Gegensatz dazu entspricht die Abstoßungsrate bei Mäusen mit ausgeschaltetem CD8-Gen der der Wildtyp-Mäuse (Haskova et al., 2000; Yamada et al., 1999 und 2001). Die korneale Abstoßungsreaktion ist mit der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ assoziiert (Hegde and Niederkorn, 2000; Joo et al., 1995). In Kornea und Kammerwasser bei abgestoßenen Transplantaten finden sich Zytokine vom T_H1-Typ (King et al., 2000; Sano et al., 1998; Yamagami et al., 1998).

Typische T_H1-Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2) und IFN- γ sind für zellvermittelte Immunreaktionen mitverantwortlich. Zu den T_H2-Zytokinen zählen IL-4, IL-5 und IL-10, die die Regulation von humoralen Immunreaktionen beeinflussen.

In Toleranzmodellen wird eine schwächere Expression der T_H1-Zytokine IL-2 und IFN- γ beobachtet als bei Tieren, die Abstoßungsreaktionen zeigen. Dagegen ist die Rolle der T_H2-Zytokine umstritten; in Toleranzmodellen wurden widersprüchliche Ergebnisse betreffend der Expression von IL-4 und/oder IL-10 beschrieben (Nickerson et al., 1997; Piccotti et al., 1997). Wahrscheinlich kann eine Immunmodulation mit T_H2-Zytokinen zu einer Transplantatakzeptanz beitragen, ohne jedoch Toleranz zu induzieren.

1.3.6 Interleukin-10

IL-10 kann eine Verschiebung von der T_H1- zur T_H2-vermittelten Immunantwort bewirken (Cua et al., 1996). Es fördert die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen, die durch Sekretion von IL-10 und TGF- β Immunantworten hemmen können (Groux et al., 1997). IL-10 hemmt die IL-12-Exkretion der antigenpräsentierenden Zellen, was eine verminderte Stimulation der T_H1-Zellen zur Folge hat (Kennedy et al., 1994).

IL-10 wird von T_H2-Zellen und Makrophagen produziert. Es wirkt immunsuppressiv, indem es die Produktion proinflammatorischer Zytokine, MHC-II-Antigene und die Ag-Präsentation hemmt (deWaal, Malefyt und Moore, 1998). Diese Eigenschaften können auch bei

systemischer Verabreichung beobachtet werden (de Waal et al., 1991; Fiorentino et al., 1991a und 1991b), wenn anhaltend hohe Konzentrationen vorliegen (Powrie et al., 1993). Darüber hinaus behindert IL-10 die Aktivierung der Makrophagen.

Virales Interleukin-10 ist das Interleukin-10-Homologon aus dem Epstein-Barr-Virus (EBV) mit ähnlichen antiinflammatorischen Eigenschaften wie physiologisches Interleukin-10. Allerdings hemmt es die T_H1-vermittelte Immunität, ohne gleichzeitig T_H2-Antworten zu stimulieren (de Vries, 1995).

1.3.7 Gentransfer von Interleukin-10 zur Modulation der Transplantatabstoßung

Bei Interleukin-10 handelt es sich um ein Zytokin mit immunsuppressiven und immunmodulatorischen Eigenschaften, weshalb es ein vielversprechender Kandidat für eine ex-vivo-Überexpression vor der Transplantation ist.

Das Problem der kurzen Halbwertszeit von Zytokinen wird lösbar durch kontinuierliche Produktion mithilfe von Gentransfer. Es konnte wiederholt nachgewiesen werden, dass die Überexpression von TGF- β und vIL-10 zur Verlängerung der Transplantatakzeptanz beispielsweise in verschiedenen allogenen Herztransplantationsmodellen führte (Josien et al., 1998; Qin et al., 1995).

1.4 Das Tiermodell

Wesentliche Hinweise zur Immunpathologie der Transplantatabstoßung wurden zunächst am Kaninchenauge gewonnen, das als Modell präferiert wurde, weil es eine ähnliche Größe aufweist wie das menschliche Auge. Allerdings sind die Untersuchungen zur Immunbiologie der Transplantatabstoßung und entsprechende Therapiestudien am Kaninchenauge wegen seines ungenügend charakterisierten Immunsystems nur bedingt aussagekräftig. Klebe et al. (2001) führten in Australien Untersuchungen an Schafaugen durch, ein Modell, das wenig Verbreitung fand.

Experimentelle Modelle in immunologisch besser charakterisierten Spezies werden favorisiert, seit man Kenntnis von der Bedeutung der Histokompatibilitätsantigene für die Transplantatabstoßung hat. So liegen bei Ratten detaillierte Kenntnisse der Haupt- und Neben-HC-Antigene vor. Die Vorzüge des Modells der perforierenden Keratoplastik am Rattenauge sind insbesondere

- die detaillierten Kenntnisse der Immungenetik von verschiedenen Ratteninzuchtstämmen,

- die Verfügbarkeit einer weiten Palette monoklonaler Antikörper gegen Zelloberflächenmarker,
- die Vergleichbarkeit immunologischer Charakteristika zur humanen Kornea, insbesondere im Bezug auf die Verteilung der HL-Antigene,
- die reproduzierbaren chirurgischen Ergebnisse unter Verwendung mikrochirurgischer Techniken.

Die folgenden Untersuchungen wurden daher unter Verwendung des Rattenmodells durchgeführt.

2 AUFGABENSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des Zytokins vIL-10 auf die Modulation von Immunreaktionen nach Keratoplastik untersucht werden. Zu diesem Zweck erfolgte der ex-vivo-Gentransfer an Korneae der Ratte. Folgende Fragestellungen sollen bearbeitet werden:

- (1) Kann eine Modulation der Immunreaktionen nach Keratoplastik durch das im Transplantat lokal und temporär überexprimierte virale Interleukin-10 erzielt werden, die ein längeres Transplantatüberleben ermöglicht?
- (2) Welche Entzündungszellen überwiegen im Transplantat?
- (3) Welche Entzündungszellen werden durch das virale Interleukin-10 gehemmt?
- (4) In welchem Teil des Transplantats finden sich Entzündungszellen?

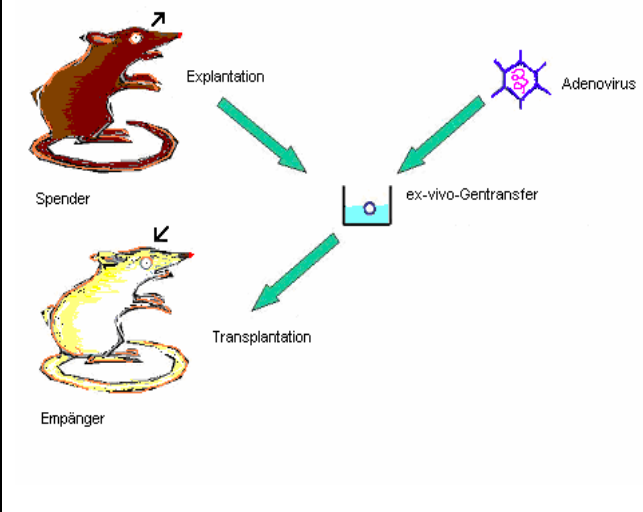
3 METHODIK

3.1 Experimentelles Modell

Die Spenderhornhäute wurden Wistar-Furth-Ratten entnommen und den als Empfänger dienenden Lewis-Ratten transplantiert (siehe Abb. 9). Diese beiden Inzuchtstämme sind MHC I/II inkompatibel und unterscheiden sich in mehreren Minor-Antigenen. Diese Kombination wird als „Highrisk-Model“ mit rascher Transplantatabstoßung angesehen.

Es gab drei verschiedene Behandlungsprotokolle für die Versuchstiere (siehe Tab. 1). Eine Gruppe erhielt Transplantate, die zuvor in-vitro mit dem therapeutischen AdvIL-10 transduziert wurden (vIL-10-Gruppe). Transduktion ist der Vorgang, bei dem das gewünschte Gen mithilfe von Viren in die Zielzelle eingebracht wird. Als Kontrollen dienten zum einen unbehandelte allogene Hornhauttransplantate (sine-Gruppe). Eine zweite Kontrollgruppe erhielt Hornhäute, die mit einem Adenoviruskonstrukt ohne therapeutisches Gen, einem so genannten Nullvektor, in-vitro transduziert wurden (Ad0-Gruppe).

Die Hornhäute der Ratten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten, an den Tagen 10, 17 und 24 nach Transplantation entnommen, fixiert und kryokonserviert. Etwa am 17. Tag nach Transplantation erfolgt die Abstoßung. Der 10. Tag ist daher repräsentativ für das Stadium vor und der 24. Tag entsprechend für das Stadium nach der Abstoßungsreaktion.

 <p>Abb. 9: Schematische Darstellung der Methode der ex-vivo-Transduktion einer Rattenhornhaut, modifiziert nach PD Dr. T. Ritter (Habilitationsschrift).</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Behandlung Zeitpunkt</th> <th>vIL-10- Gruppe Anzahl n</th> <th>sine- Gruppe Anzahl n</th> <th>Ad0- Gruppe Anzahl n</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tag 10</td> <td>4</td> <td>4</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Tag 17</td> <td>4</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Tag 24</td> <td>4</td> <td>4</td> <td>4</td> </tr> </tbody> </table>	Behandlung Zeitpunkt	vIL-10- Gruppe Anzahl n	sine- Gruppe Anzahl n	Ad0- Gruppe Anzahl n	Tag 10	4	4	4	Tag 17	4	4	5	Tag 24	4	4	4
	Behandlung Zeitpunkt	vIL-10- Gruppe Anzahl n	sine- Gruppe Anzahl n	Ad0- Gruppe Anzahl n													
	Tag 10	4	4	4													
	Tag 17	4	4	5													
Tag 24	4	4	4														
<p>Tab. 1: Anzahl der Tiere in den jeweiligen Gruppen</p>																	

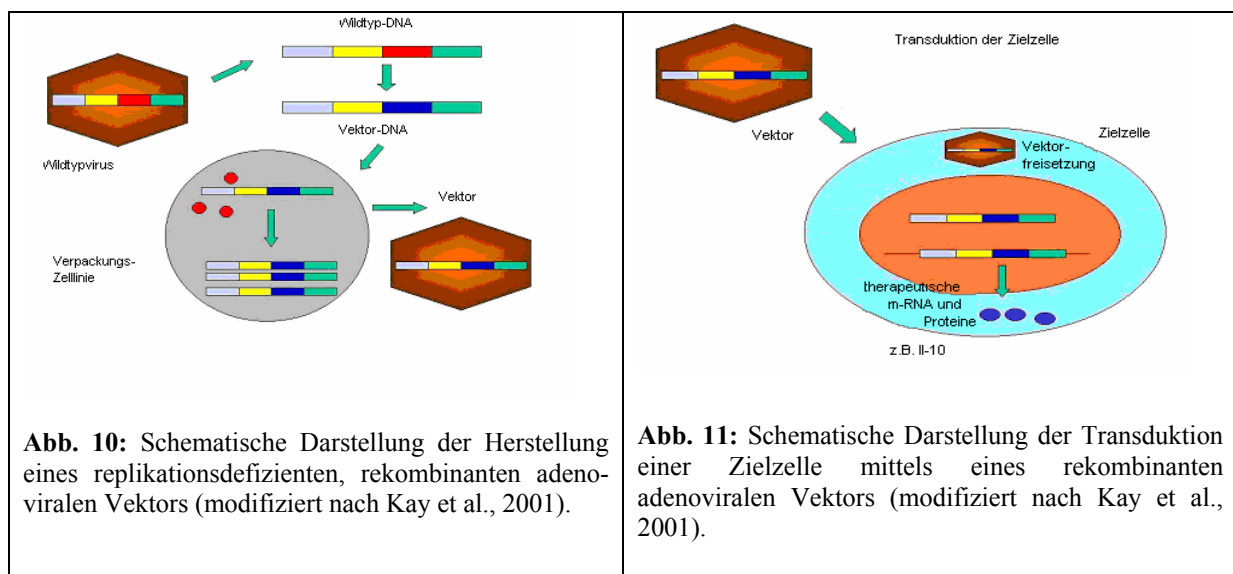
3.2 Methoden

3.2.1 Adenoviraler Gentransfer in ex-vivo-kultivierten Rattenkorneae

Zur Herstellung der beiden adenoviralen Vektoren wurden Wild-Typ-Adenoviren derart verändert, dass ihre pathogenen Eigenschaften und ihre Replikationsfähigkeit ausgeschaltet wurden.

In die DNA des Vektors wurde ein Transgen eingeführt (siehe Abb. 10). Die Vektor-DNA wurde zunächst über eine Verpackungszelllinie vervielfältigt. Der therapeutische Vektor (AdvIL-10) transduzierte die Zielzelle und führte das betreffende Gen ein. Die Zielzelle, die das IL-10-Gen erhielt, begann mit der Synthese des vIL-10.

Im Falle des Nullvektors (Ad0) wurde dieses Transgen nicht eingeführt. Es kamen also das therapeutische AdvIL-10-Konstrukt und das als Kontrolle dienende Konstrukt Ad dl 312 (Ad0) zur Anwendung.



Aus dem Spendertier (Wistar-Furth Ratte) wurde mit Hilfe eines 3,5-mm-Trepans die zentrale Hornhaut ausgestanzt und kultiviert. Während der Kultivierung der Korneae erfolgte der adenovirale Gentransfer durch eine dreistündige Inkubation mit 500 µl Transduktionslösung mit 1×10^8 pfu/Kornea bei 37°C. Bevor die Hornhäute der allogenen Hornhauttransplantation zugeführt wurden, erfolgte die Quantifizierung der Zytokinproduktion. Hierzu wurden die Überstände der Korneae zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gentransfer geerntet und mittels ELISA analysiert.

3.2.2 Experimentelles Keratoplastikmodell

Alle Tierversuche wurden nach den Anforderungen der „Guiding Principles in the Care of Animals“ des National Institute of Health, Bethesda, und den Richtlinien der Senatsverwaltung für Wissenschaft und Forschung, Berlin, durchgeführt. Die Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren wurde nach § 8 des Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin am 14.01.2003 mit dem Aktenzeichen Reg 0238/02 erteilt.

Es wurde jeweils nur an einem Auge transplantiert, so dass die Tiere auf der anderen Seite ihre Sehkraft behielten.

Für die Versuche wurden 8 bis 10 Wochen alte, weibliche Ratten mit einem Gewicht von 200 bis 250 g verwendet. Es wurden Zuchtlinien verwendet, die sich in ihren MHC Klasse I und II Histokompatibilitätsantigenen unterscheiden, also ein komplettes MHC I/II Mismatch aufwiesen (Gill, III et al., 1987).

Das Spendertier (Wistar Furth, WF) wurde durch eine Inhalationsnarkose des Gemischs von Kohlendioxid und Lachgas getötet. Nachfolgend wurde mit einem 3,5-mm-Trepan die Hornhaut entnommen und ex-vivo transduziert. Das Empfängerauge wurde vor dem Eingriff mit 1% Atropinsulfat weitgetropft, um Irisschäden während der Transplantation zu vermeiden. Die Empfängertiere erhielten eine intramuskuläre Injektion einer Kombination aus Ketaminhydrochlorid (z.B. Ketavet®) in einer Dosis von 16,5 mg/Tier à 200 g und Xylazinhydrochlorid (z.B. Rompun®) dosiert mit 0,7 ng/Tier à 200 g zur Anästhesie. Mit einem 3,0-mm-Trepan wurde aus dem Empfängertier die rechte Hornhaut ausgestanzt und die transduzierte Spenderhornhaut mittels fortlaufender 10-0 Nylon-Naht fixiert. Um die Augenvorderkammer zu stabilisieren und Linsen- und Iris-Schädigungen zu vermeiden, wurde eine viskoelastische Substanz (Healon) eingebracht und vor dem Verschluss der Wunde wieder entfernt. Eine kleine, anschließend in die Vorderkammer eingebrachte Luftblase diente dazu, die frisch eingesetzte Kornea von der Iris zu trennen (Pleyer et al., 1995). Das Nahtmaterial verblieb bis zum Versuchsende im Auge, um keine weitere Irritation zu verursachen. Die transplantierten Tiere wurden unter dem Operationsmikroskop dreimal innerhalb der ersten postoperativen Woche und anschließend täglich kontrolliert. Der Grad der Korneatrübung diente als Indikator für die Transplantatabstoßung. Bei einer Bewertungs-Skala von 0 bis 4 galt eine Trübung von 3 oder höher als abgestoßen. Eine völlig klare Kornea erhielt die Bezeichnung 0.

3.2.3 Organentnahme und Lagerung

Den Tieren, bei denen das Langzeitüberleben untersucht werden sollte, wurden am Tag der Abstoßung nach Tötung die Augen entnommen. Mit den Tieren, bei denen die Entzündungsreaktion zu bestimmten Zeitpunkten betrachtet werden sollte, wurde an den Tagen 10, 17 und 24 nach Keratoplastik ebenso verfahren. Den Augen wurden die Kornea samt Iris, Ziliarkörper und Skleraring entnommen und mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Dann erfolgte die blasenfreie Einbettung in Aluminiumförmchen, die Cryo-OCT-Compound enthielten und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bis zur Weiterverarbeitung in einem Gefrierschrank bei -70°C.

3.2.4 Kryostatschnitttechnik und Präparation der Gefrierschnitte

Zum Schneiden der Organe wurde der Frigocut-Kryostat verwendet. Bei einer Blocktemperatur von -21 °C und einer Kammertemperatur von -16 °C wurden 5 µm dünne Schnitte der Präparate angefertigt. Dies erfolgte bei den 3 Behandlungsgruppen vIL-10, Adv0 und sine, die jeweils zu den drei Zeitpunkten Tag 10, 17 und 24 nach Transplantation untersucht werden sollten, getrennt nach den sechs Zellarten und dem Kontroll-Antikörper. Dabei wurden pro Tier und Zellart jeweils 15 Schnitte aus dem mittleren Teil des Organs angefertigt, um für die Zählung und die Fotodokumentation mehrere Schnitte zur Verfügung zu haben. Die Gefrierschnitte wurden auf Objektträgern mit verbesserter Gewebehaftung aufgebracht und für 60 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend erfolgten die Fixierung in Standküvetten in eiskaltem Ethanol-Methanol-Gemisch (2:1) für 7 min und eine erneute Trocknung bei Raumtemperatur für 10 min. Bis zur immunhistochemischen Färbung wurden die Gefrierschnitte in Aluminiumfolie gewickelt und in einer luftdichten Box verpackt bei -70 °C aufbewahrt.

3.2.5 Immunhistochemische Färbung der Schnitte

Die immunhistochemische Darstellung der verschiedenen für die Entzündung mitverantwortlichen Zellen in den Gewebeschnitten erfolgte durch ihre spezifischen Zelloberflächen-Antigene mit Hilfe der Avidin-Biotin-Komplex-Immunoperoxidase- (ABC-) Technik. Der in der Maus generierte unkonjugierte monoklonale Primärantikörper richtet sich gegen das zu bestimmende Oberflächenantigen der Ratte. Der im Pferd generierte Sekundärantikörper wiederum bindet mit seiner antigenbindenden Region an das kristalline Fragment des primären Mausantikörpers. Der Sekundärantikörper ist an Biotin konjugiert. Die freien Stellen des peroxidasekonjugierten Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an

das Biotin des Sekundärantikörpers. Die Peroxidase schließlich wird mit Chromogen sichtbar gemacht. Für die Kontrollen kommt ein Primärantikörper zum Einsatz, der keine Spezifität besitzt und daher beim Waschen fortgespült wird.

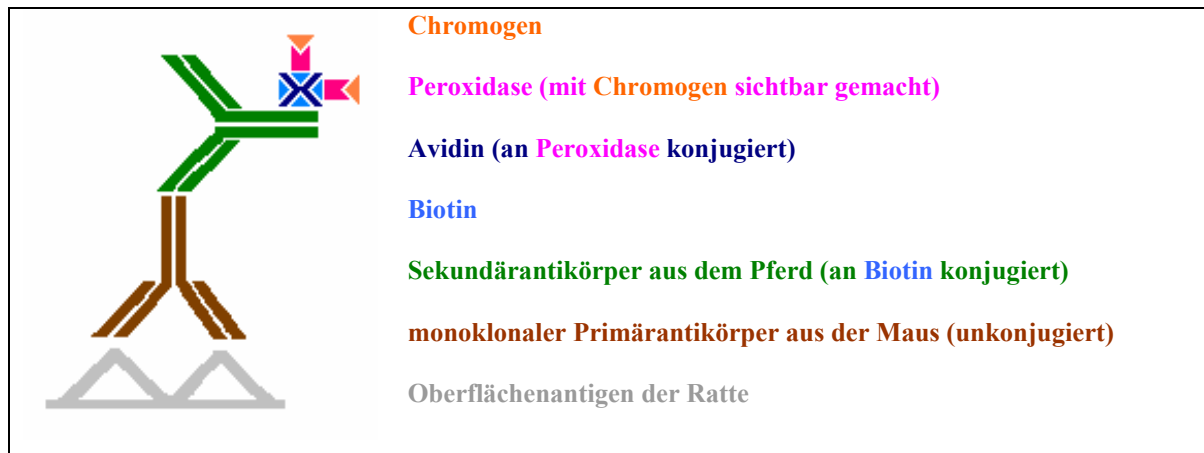


Abb. 12: Avidin-Biotin-Komplex-Immunoperoxidase-Technik (eigene Abbildung).

Die Gefrierschnitte wurden zuerst 60 min bei Raumtemperatur aufgetaut, wobei die Aluminiumfolie die Kondensation der Luftfeuchtigkeit verhinderte. Nach Entfernen der Aluminiumfolie wurden die Schnitte für 5 min in eiskaltem 95-prozentigen Methanol fixiert. In Standküvetten folgte eine dreimalige je dreiminütige Spülung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Puffer).

Die Inaktivierung der endogenen Peroxidase ist notwendig, um unerwünschte unspezifische Färbungen zu vermeiden. Hierfür erfolgte eine 30 minütige Inkubation in Standküvetten bei Raumtemperatur in einprozentiger Wasserstoffperoxidlösung (gelöst in Methanol). Es folgten 2 weitere 5 minütige Wasch-Schritte mit PBS.

Um eine unspezifische Kreuzreaktivität des primären Antikörpers mit dem Gewebe zu minimieren, wurde eine 20 minütige Inkubation mit 100 µl Pferdeserum vorgenommen. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen.

Nun wurden die Präparate mit dem primären monoklonalen Antikörper inkubiert. Um die optimale Verdünnung der Antikörper (in PBS) zu finden, wurde eine Titration an bekannt positiven Präparaten durchgeführt. Bei Verwendung von Primär- und Sekundärantikörpern wurden für beide Antikörper verschiedene Konzentrationen angesetzt und in Form einer Schachbrett-Titration kombiniert. Die optimale Verdünnungskombination war an dem Präparat, das die stärkste spezifische Anfärbung und die geringste Hintergrundfärbung aufwies, erkennbar. Jeder Schnitt wurde mit 200 µl Antikörperlösung (1:700) bedeckt und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 10 min und erneutem 5 minütigen Einwirken von 100 µl des zweiprozentigen Pferdeserums wurden die Schnitte mit 200 µl des sekundären Antikörpers in der Konzentration von 1:100 (in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für 10 min folgte die 30 minütige Inkubation mit dem Vectastain-Reagenz, wobei jedes Präparat mit 200 µl Reagenz benetzt wurde. Dieses wurde 30 min zuvor aus PBS, Avidin und Biotin hergestellt, um die Bildung von Komplexen zu ermöglichen. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 10 min mit PBS gewaschen.

Darauf folgte die zweiminütige Inkubation mit je 200 µl DAB-Peroxidaselösung bei Raumtemperatur. Die Peroxidase bewirkte eine Abspaltung von Wasserstoffmolekülen vom Wasserstoffperoxid, die mit Diaminobenzidin (DAB) unlösliche dunkelbraune Farbkomplexe bildeten. Durch Waschen mit PBS wurde diese Reaktion beendet.

Die Schnitte wurden für 45 Sekunden in Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend 5 min lang unter Leitungswasser gespült. Die feuchten Präparate wurden mit je 1 Tropfen Mounting-Medium-Harz und einem Deckgläschen bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die Präparate wurden bei einer 120-fachen Vergrößerung betrachtet. Die Zählung der gefärbten Zellen erfolgte mittels Zählraster, wobei die Zellen mehrerer Raster pro Gesichtsfeld gezählt und dann mit der Anzahl der Raster multipliziert wurden. In die Statistik gingen jeweils die Mittelwerte ein, die sich aus den 10 Schnitten pro Tier und Zellart ermitteln ließen. Die Zählung der Zellen erfolgte dabei getrennt nach Lokalisation, also Transplantat, Übergangsbereich und Empfängerkernea sowie für die Absolutzahl der gesamten Kernea.

Alle Ergebnisse sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte plus/minus Standardfehler (standard error mean, SEM) dargestellt. Die Angabe der mittleren Überlebenszeit nach Transplantation erfolgte als Median. Aussagen zur statistischen Signifikanz wurden bei Varianzanalysen ohne Normalverteilung mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests getroffen. Bei Lageunterschieden mit Normalverteilung wurde sich des Mann-Whitney-U-Tests bedient, wobei sich eine Aussage zum p-Wert treffen ließ. Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe von Boxplots. Sie zeigen in dem Kästchen die Verteilung der mittleren 75% an. Der Median entspricht dem horizontalen Strich im Kästchen. Außerhalb des Kästchens lassen sich die Maximal- und Minimalwerte ablesen.

3.2.7 Die Transplantatüberlebenszeit

Für die Transplantationen wurden die Spender-Hornhäute mit jeweils 1×10^8 pfu der adenoviralen Vektoren (AdvIL-10 mit dem therapeutischen Interleukin sowie Adv0 als Kontrollvektor ohne therapeutisches Gen) ex-vivo transduziert. Als zweite Kontrollgruppe dienten nichttransduzierte Hornhäute (sine). Die transplantierten Tiere wurden 2, 4 und 7 Tage nach der Operation und anschließend über vier Wochen täglich kontrolliert. Die Hornhauttrübung wurde in einer Skala von 0 bis 4 beurteilt. Eine völlig klare Kornea erhielt dabei die Bezeichnung 0 (siehe Abb. 13), wobei eine Bewertung ab 3 als abgestoßen galt (siehe Abb. 14). Die Transplantatüberlebenszeiten wurden in den drei Gruppen verglichen und in einer Kaplan-Meier-Kurve graphisch dargestellt.

3.3 Materialien

3.3.1 Monoklonale Antikörper

Alle Antikörper wurden von Pharmingen, San Diego, CA, USA bezogen.

Antikörper	Zelltyp	Epitop
Anti-CD4-Clon OX-35	T-Zellen der Klasse MHC II (T-Helfer-Zellen)	CD4 Rezeptor = Antigenrezeptor der Zelloberfläche, der mit MHC-II-Molekülen von antigenpräsentierenden Zellen interagiert
Anti-CD8-Clon OX-8	T-Zellen der Klasse MHC I (T-Suppressor/ Zytotoxisch)	membranproximale Domäne der α -Kette des CD8a-Membranantigens
Anti-CD25-Clon 22091°	T-Lymphoblasten, dendritische T-Zellen	CD 25 Rezeptor = α -Kette des IL-2-Rezeptors
Anti-CD45R-Clon His-24	B-Lymphozyten	CD 45 Rezeptor
Anti-NK22641D	Natürliche Killerzellen und eine kleine Subpopulation von T-Lymphozyten	NKR-P1A (Typ-II-membranintegriertes Protein mit extrazellulärer C-Typ-Lectindomäne = NK-Zell-aktivierender Rezeptor)
Anti-ED1-Clon 1C7	Mononukleäre Phagozyten (Gewebs-, Alveolarmakrophagen, periphere Monozyten)	ED1
Kontroll-Antikörper 03251D	kein Zelloberflächen-Ag, dient als Kontrolle	

Tab. 2: Auflistung der für die Immunhistologie-Färbungen verwendeten Ak und ihrer Zielstrukturen

3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Pipetten für 1 ml-, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner, Nürtingen, D
Verstellbare Pipetten mit Spitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorfgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Deckgläschen 20x26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (haftungsverbessert)	Sigma, Deisenhofen, D
Mounting-Medium Harz	DAKO, CA, USA
Aluminiumfolie	

3.3.3 Färbekits und Versuchssysteme

Avidin-Biotin-Complex (ABC) -Färbekit Vektor	Alexis, D
Diaminobenzidin (DAB) -Peroxidase-Kit	Alexis, D
vIL-10 ELISA-Kit	Coulter-Immunotech, Hamburg, D

3.3.4 Lösungen und Puffer

PBS-Puffer mit pH 7,4	8 g NaCl + 1,3 g Na ₂ HPO ₄ + 4 g NaH ₂ PO ₄ + 1l destilliertes Wasser
1%ige Wasserstoffperoxidlösung	gelöst in Methanol
Pferdeserum 2%	(Pferdeserum des ABC-Färbe-Kits) gelöst in PBS-Puffer
Vectastain	100 µl PBS-Puffer + 2 µl A + 2 µl B (aus dem Alexis-Kit)
Peroxidase-Lösung (DAB-Kit):	100 µl Aqua dest. + 2 µl Kit-Puffer- Lösung + 4 µl DAB + 2 µl Peroxidase
Hämatoxylin	

3.3.5 Geräte, Messgeräte

Mikroskop	Nikon, Düsseldorf, D
Foto-Kamera	Nikon, Düsseldorf, D
Waage	Sartorius, Göttingen, D
Frigocut-Kryostat 2100 E	Reichert-Jung, Wien, A
Standküvetten, Bechergläser, Spatel, Löffel, Wecker	

3.3.6 Explantationsmaterialien

Hornhautscheren, Pinzetten	
Operationsmikroskop	Karl-Zeiss, Jena, D
Kryo-O.C.T. Compound	Scientific Products, Irvine, CA, USA
physiologische Kochsalzlösung	
flüssiger Stickstoff	

3.3.7 Adenovirale Konstrukte

AdvIL-10	PD Dr. T. Ritter, Berlin, D
Ad dl 312 (Ad0)	Dr. J.K. Kolls, New Orleans, LO, USA

3.3.8 Versuchstiere

Inzucht-Ratten, weiblich, 200-250 g, mit komplettem MHC-Mismatch:

Lewis (LEW/RT1 ^l)	M&B, Ry, DK, Charles River, Bad Sulzfeld, D
Wistar-Furth (WF/RT1 ^u)	M&B, Ry, DK, Harlan Winkelmann, Borchten, D

4 ERGEBNISSE

4.1 *Transplantatüberleben*

Zum Gentransfer in korneale Endothelzellen wurden adenovirale Vektoren (Adv) genutzt. Durch die Genexpression ist eine Modulation des Zytokinprofils (T_H1/T_H2) unmittelbar nach der Transplantation möglich.

Dem Nachweis des Transduktionserfolgs an der Kornea mittels Fluoreszenzmikroskopie und Bestimmung der Zytokinproduktion folgte der in-vivo-Einsatz der mit AdvIL-10-transduzierten Korneae zur Modulation der Immunreaktion nach Keratoplastik. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass durch adenoviralen Gentransfer vor allem das Endothel transduziert wurde, jedoch nicht das Hornhautepithel bzw. Keratozyten im Hornhautstroma.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Hornhauttransplantate ex-vivo mit dem adenoviralen Konstrukt für IL-4 transduziert. Hierbei zeigte sich, dass der IL-4 Gentransfer zu keiner signifikanten Immunmodulation der Transplantatabstoßung führte (Pleyer et al., 2000). Da im allogenen Ratten-Modell der Nierentransplantation nach Ko-Transduktion von IL-4 mit vIL-10 in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kupiec-Weglinski (Los Angeles, USA) ein signifikanter Effekt auf das Transplantatüberleben erzielt werden konnte, sollte der Einfluss einer Immunmodulation mit AdvIL-10 im Modell der Keratoplastik überprüft werden. Das verwendete Transplantationsmodell Wistar-Furth-Spender auf Lewis-Empfänger ist ein „starkes“ Abstoßungsmodell und weist einen kompletten Mismatch innerhalb der MHC-I/II- sowie Minor-HC-Gene auf.

Für die Transplantationen wurden die Spender-Hornhäute entweder mit dem adenoviralen Vektor AdvIL-10 (mit dem therapeutischen Interleukin) oder Adv0 als Kontrollvektor (ohne therapeutisches Gen) ex-vivo transduziert. Als zweite Kontrollgruppe dienten nichttransduzierte Hornhäute (sine).

Die transplantierten Tiere wurden postoperativ wie oben beschrieben untersucht und die Hornhaut nach den genannten Kriterien eingeschätzt. Postoperativ kommt es zunächst zu einem Epithel und Stromaödem. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer Aufklärung, wenn das Endothel seine Funktion aufnimmt. Eine anfängliche Erosio schließt sich meist innerhalb von 2-4 Tagen. In den Fällen, in denen es zu einer Abstoßungsreaktion kommt, zeigt sich eine erneute Eintrübung, mit Stromaödem, Vorderkammerreizzustand, Endothelpräzipitaten und gegebenenfalls Khodadoust-Linie oder Neovaskularisationen.

Eine völlig klare Kornea erhielt dabei die Bezeichnung 0 (siehe Abb. 13), wohingegen eine Bewertung ab 3 als abgestoßen galt (siehe Abb. 14).

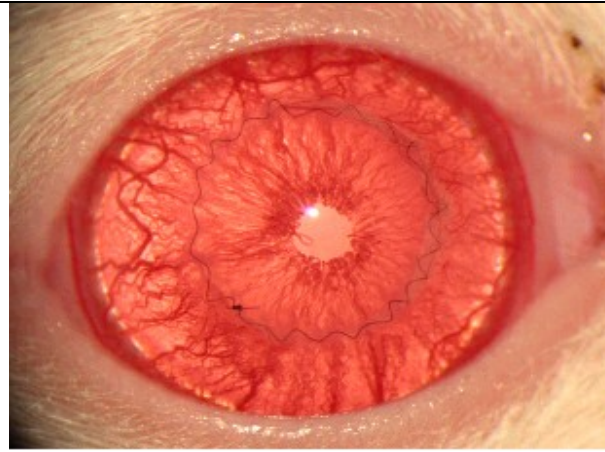


Abb. 13: Fotografie einer Keratoplastik in der Ratte. Erkennbar sind die klare Empfängerhornhaut, die fortlaufende Naht sowie das klare Transplantat, durch das die Iris sichtbar ist. Ein solch klares Transplantat erhielt die Bewertung 0.

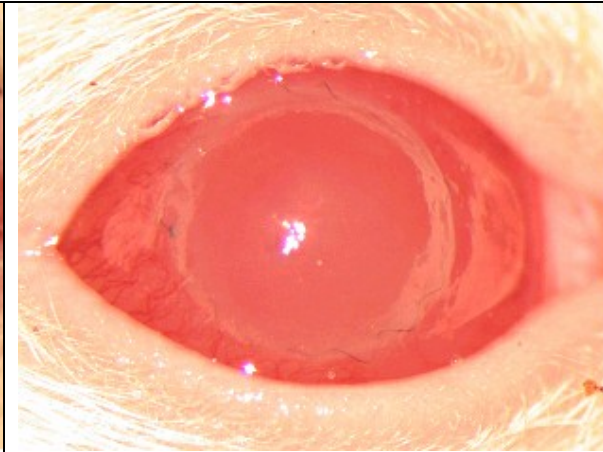


Abb. 14: Fotografie einer Keratoplastik in der Ratte. Erkennbar sind die fortlaufende Naht und eine trübe Kornea, die keinen Einblick in das Auge erlaubt. Dieses getrübbte Transplantat erhielt die Bewertung 4. (eigene Abbildungen)

Die Transplantatüberlebenszeiten wurden in den drei Gruppen verglichen und in einer Kaplan-Meier-Kurve graphisch dargestellt (siehe Abb. 15). Die durchschnittliche Überlebenszeit (Median) der Transplantate ohne Behandlung (sine, n=6) lag bei 17 Tagen. Die Überlebenszeit der mit Ad0 transduzierten Korneae (n=6) lag bei 20,5 Tagen. Der ex-vivo-vIL-10-Genstransfer in die Spenderkornea führte zu keiner signifikant verlängerten Transplantatüberlebenszeit. Hier lag die mittlere Transplantatüberlebenszeit (Median) bei 15 Tagen (n=7) (siehe Abb. 15).

Der Einsatz des therapeutischen Gens führte also zu keiner Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit. Interessanterweise weist der Kontrollvektor (Ad0) eine Tendenz zur Überlebenszeitverlängerung auf; $p > 0,05$.

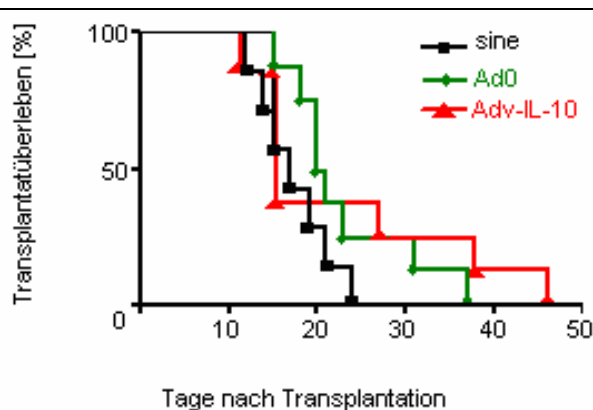


Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Transplantatüberlebenszeiten nach Transduktion mit AdvIL-10, Kontrollvektor (Ad0) und bei unbehandelten Hornhäuten (sine).

Gruppe	Anzahl n	Überlebenszeit (Median) ±SEM
Sine	6	17 Tage
Adv0	6	20,5 Tage
vIL-10	7	15 Tage

Tab. 3: Anzahl der Tiere in den drei Gruppen und die mediane Überlebenszeit.

4.2 Immunhistologische Untersuchungen

Zur Beurteilung der Immunpathologie und zellulären Infiltration im Transplantat wurden zu jedem Versuchsansatz immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden Transplantate zu festgelegten Zeitpunkten (Tag 10, 17, 24) nach dem Eingriff kryofixiert und mit spezifischen monoklonalen Antikörpern inkubiert. Der Färbung mittels ABC-Methode folgten die Zellzählung und die Fotodokumentation getrennt nach Behandlungsansatz und Zeitpunkt (siehe Abb. 16 und 17, eigene Abbildungen).

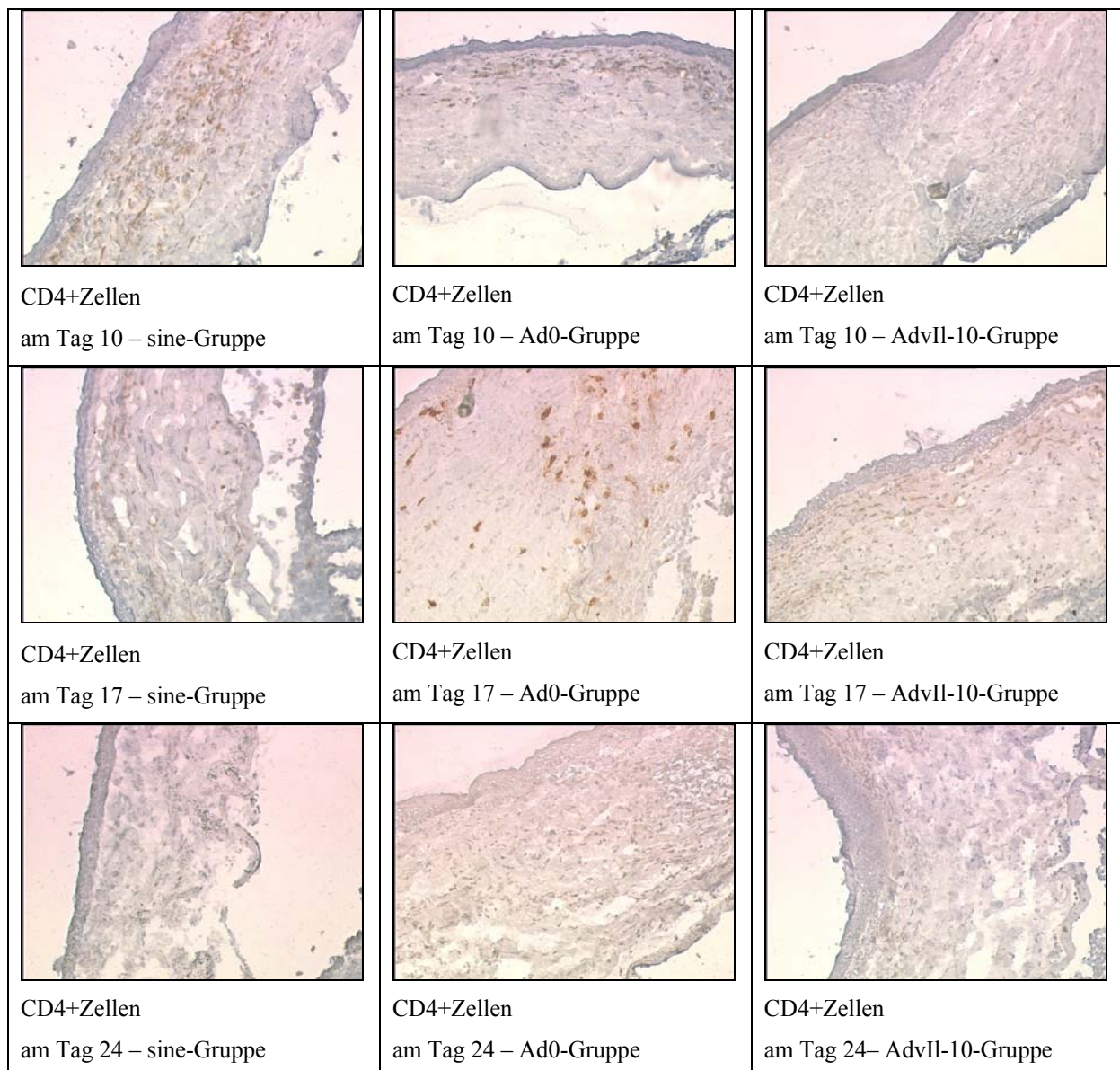


Abb. 16: Repräsentative Darstellung von CD4+-Zellen (T_H) in Transplantaten der 3 Behandlungsgruppen zu den 3 Zeitpunkten (80-fache Vergrößerung): Die Anzahl der infiltrierenden CD4+Zellen ist in der Therapiegruppe (AdvIL-10) am Tag 10 nach Transplantation verringert, der Unterschied zwischen den Gruppen ist jedoch am Tag 24 nach Transplantation nicht mehr sichtbar. Die CD4+Zellen erscheinen braun gefärbt. (eigene Fotografien)

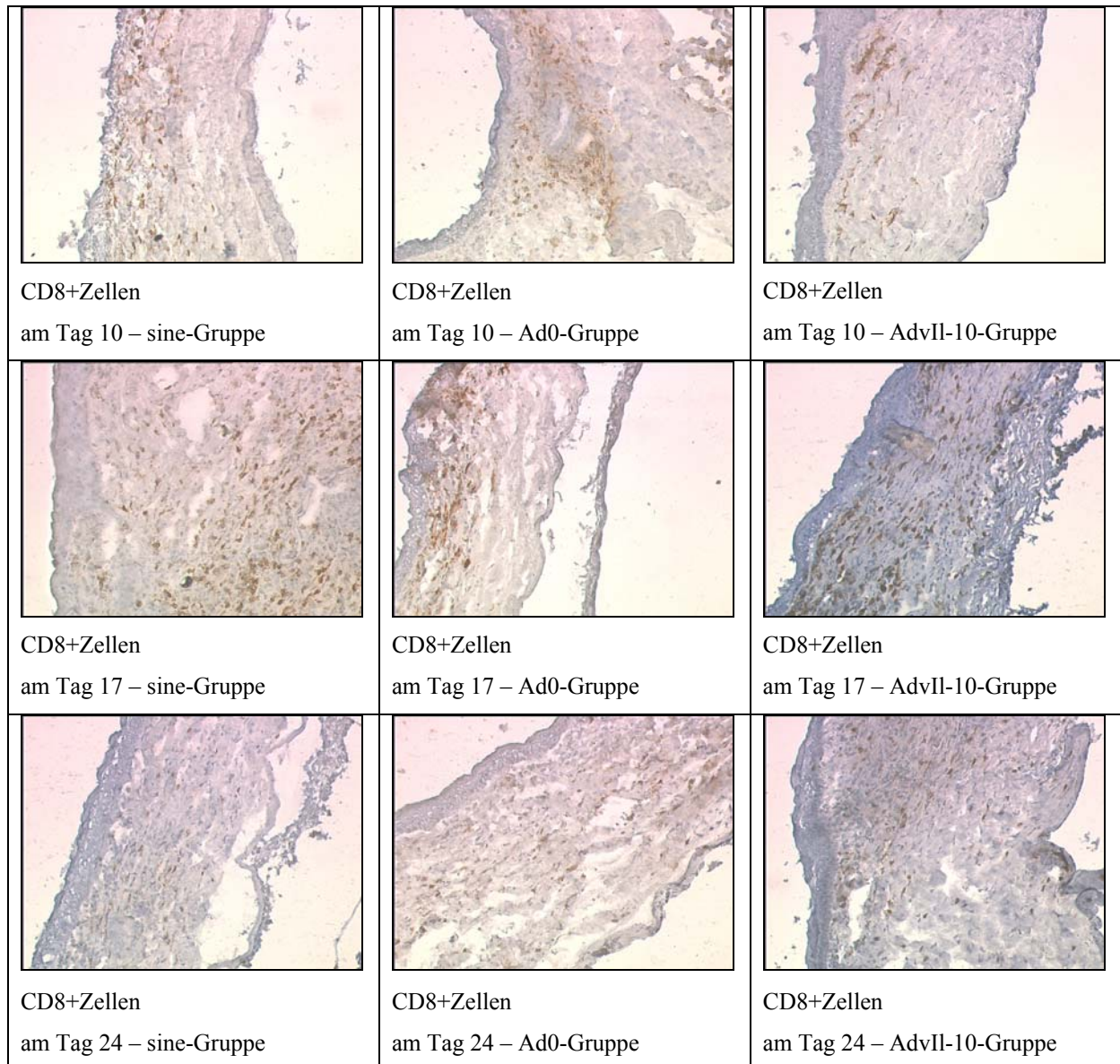


Abb. 17: Repräsentative Darstellung von CD8+Zellen ($T_{\text{Zytotoxisch}}$) in Transplantaten der 3 Behandlungsgruppen zu den 3 Zeitpunkten (80-fache Vergrößerung): Die Anzahl der infiltrierenden CD8+Zellen ist in der Therapiegruppe (AdvIL-10) am Tag 10 nach Transplantation verringert, der Unterschied zwischen den Gruppen ist jedoch bereits am Tag 17 nach Transplantation nicht mehr sichtbar. Die CD8+Zellen erscheinen braun gefärbt. (eigene Fotografien)

4.2.1 Vergleich der drei Behandlungsgruppen bezüglich der Zellzahl

Für die verschiedenen Zellpopulationen wurde die Zellzahl in den Kryostatschnitten an den Tagen 10, 17 und 24 nach Transplantation ermittelt und in den drei Behandlungsgruppen verglichen. Es handelt sich um Gesamtzahlen. Die meisten Zellen finden sich dabei jeweils am Tag 17, an dem die Abstoßungsreaktion am stärksten ist. Die Zellzahl steigt von Tag 10 zu Tag 17 an, um dann bis Tag 24 unter die Zahl von Tag 10 zu sinken. Die Entzündungsreaktion klingt ab. Im Folgenden werden die verschiedenen Zellpopulationen getrennt betrachtet.

CD4+Zellen:

Der entzündungshemmende Effekt von vIL-10 ist auf die Zellpopulation der CD4+Zellen am größten: Die CD4+T-Zellzahl (siehe Abb. 16) war am Tag 10 nach Transplantation in der AdvIL-10 Gruppe verringert ($p < 0,05$). Dieser Effekt war jedoch für die CD4+Zellen am Tag 24 nicht mehr nachweisbar (Abb. 18).

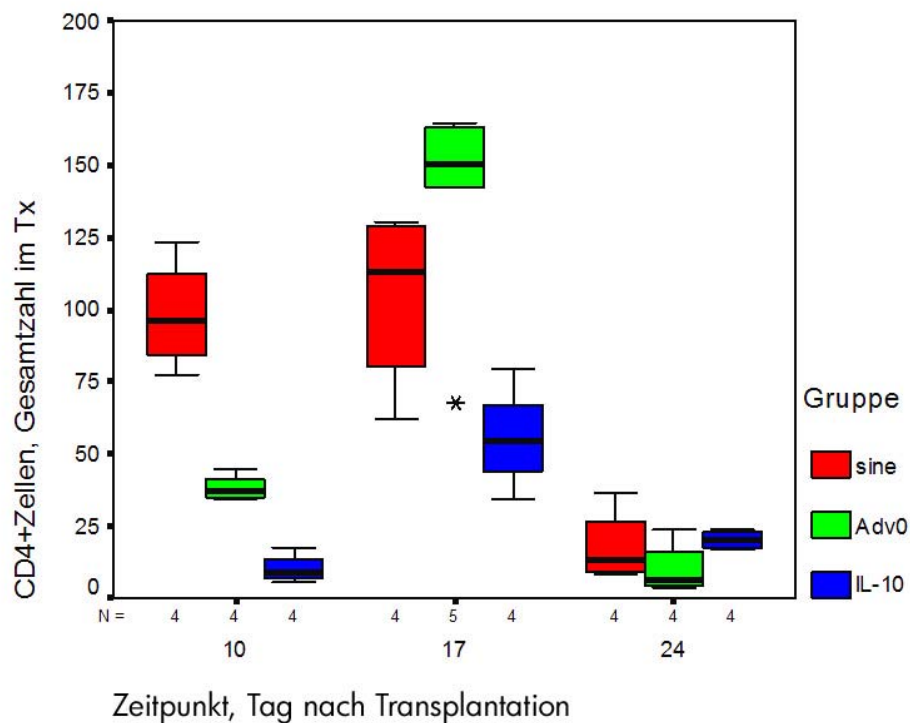


Abb. 18: Grafische Darstellung der Gesamtzellzahl der **CD4+Zellen (T_H)**. Verglichen wurden die drei Behandlungsgruppen, also die unbehandelten (sine), die mit Leervektor behandelten (Adv0) und die mit viralem IL-10 behandelten Korneae (IL-10) zu den drei Zeitpunkten nach Transplantation. Tx = Transplantat, * = Extremwert Adv0, $p < 0,05$.

CD8+Zellen:

Auch bei den CD8+Zellen ($T_{\text{Zytotoxisch}}$) trifft zu, dass sich in der vIL-10-Gruppe weniger Zellen im Transplantat nachweisen lassen als in den Kontrollgruppen. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den drei Gruppen hier geringer als bei den CD4+Zellen. Auch hier gleichen sich am Tag 24 die drei Gruppen einander an.

Die CD8+T-Zellzahl (siehe Abb. 17) war am Tag 10 nach Transplantation in der AdvIL-10 Gruppe verringert ($p > 0,05$); dieser Effekt war jedoch für CD8+Zellen am Tag 17 nicht mehr nachweisbar.

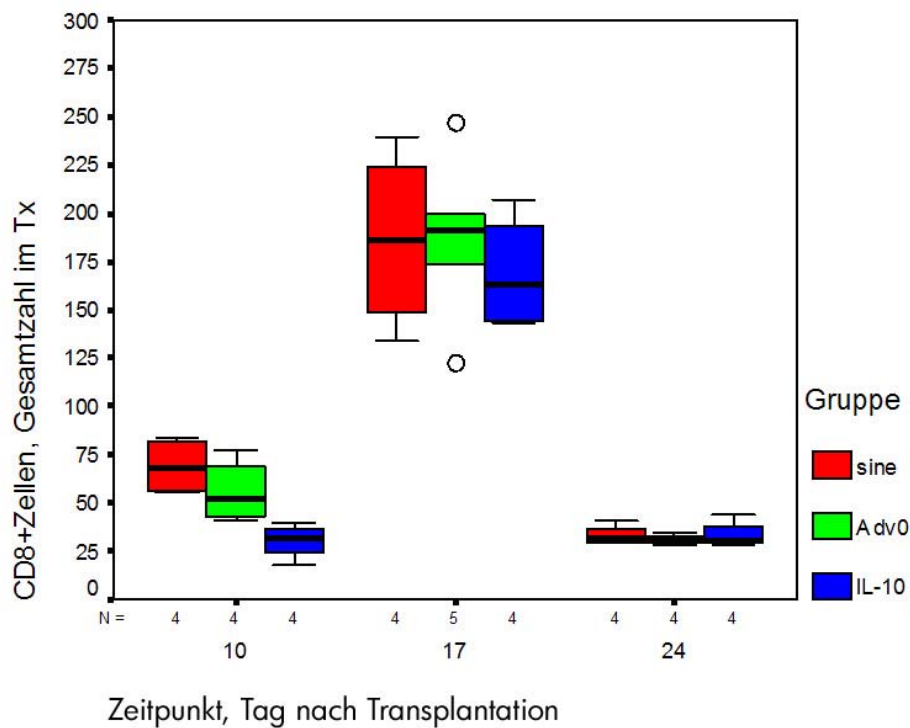


Abb. 19: Grafische Darstellung der Gesamtzellzahl der **CD8+Zellen** ($T_{\text{Zytotoxisch}}$). Verglichen wurden die drei Behandlungsgruppen, also die unbehandelten (sine), die mit Leervektor behandelten (Adv0) und die mit viralem IL-10 behandelten Korneae (IL-10) zu den drei Zeitpunkten nach Transplantation.

Tx = Transplantat, \circ = Ausreißer, $p > 0,05$.

Natürliche Killerzellen:

Bei dieser Zellpopulation lassen sich an den Tagen 10 und 24 verminderte Zellzahlen im Vergleich zu den Kontrollgruppen anfärben. Am Tag 17, also während der Abstoßung, liegt die Zellzahl in den beiden mit transduzierten Korneae behandelten Gruppen über der der sine-Gruppe.

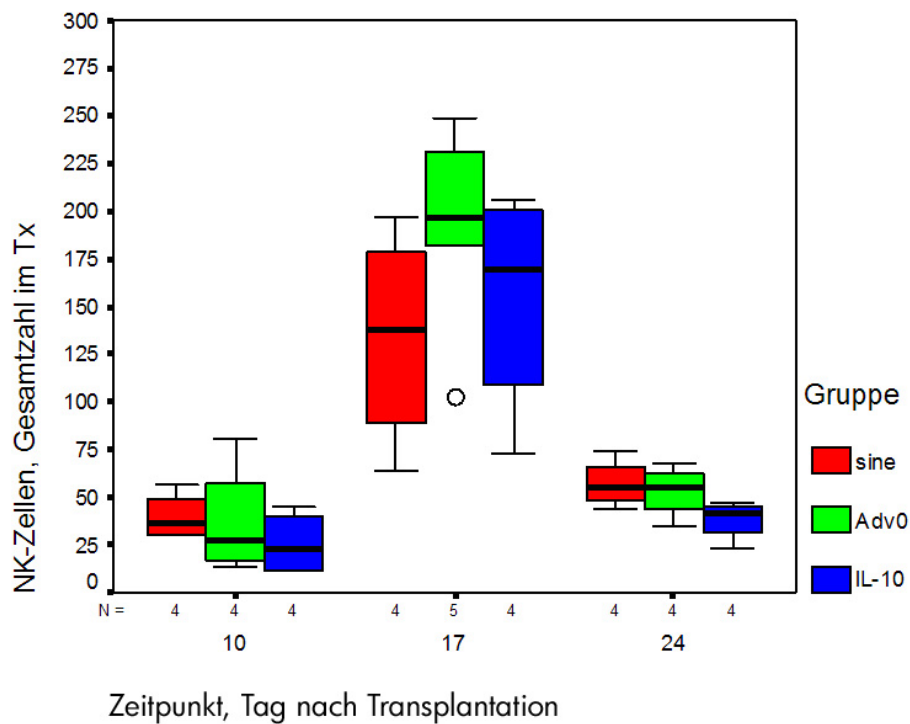


Abb. 20: Grafische Darstellung der Gesamtzellzahl der **Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)**. Verglichen wurden die drei Behandlungsgruppen, also die unbehandelten (sine), die mit Leervektor behandelten (Adv0) und die mit viral induziertem IL-10 behandelten Korneae (IL-10) zu den drei Zeitpunkten nach Transplantation. Tx = Transplantat, \circ = Ausreißer Adv0, $p > 0,05$.

Monozyten:

Auf die Monozyten weist vIL-10 keinen suppressiven Effekt auf. Hinsichtlich der Anzahl der Monozyten unterscheiden sich die drei Gruppen kaum. Am Tag 10 ist die Zahl der Monozyten in der vIL-10-Gruppe und an den Tagen 17 und 24 in der sine-Gruppe am geringsten.

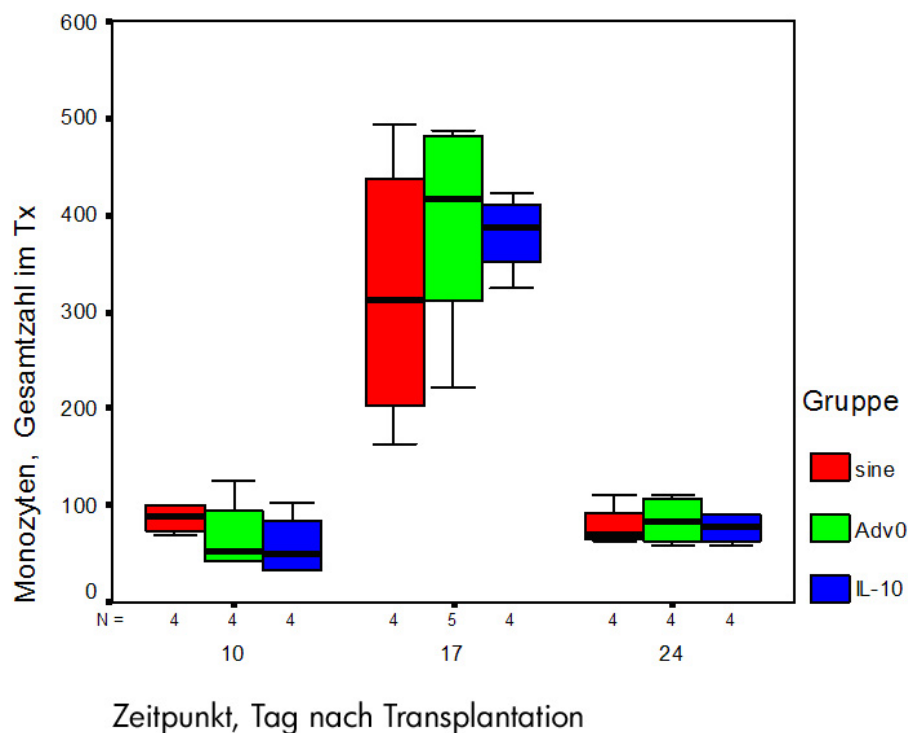


Abb. 21: Grafische Darstellung der Gesamtzellzahl der **Monozyten (Mononukleäre Phagozyten)**. Verglichen wurden die drei Behandlungsgruppen, also die unbehandelten (sine), die mit Leervektor behandelten (Adv0) und die mit viral induziertem IL-10 behandelten Korneae (IL-10) zu den drei Zeitpunkten nach Transplantation. Tx = Transplantat, $p > 0,05$.

Dendritische T-Zellen und B-Lymphozyten:

Für die Dendritischen T-Zellen (aktivierte T-Zellen = CD25+Zellen) und B-Lymphozyten (CD45+Zellen) lässt sich kein suppressiver Effekt durch vIL-10 nachweisen. Am Tag 10 ist die CD25+Zellzahl in der Adv0-Gruppe etwas geringer als in den beiden anderen Gruppen (siehe Abb. 23). Abgesehen davon lassen sich für beide Zellpopulationen hinsichtlich der Zellzahl zwischen den drei Behandlungsgruppen keine Unterschiede feststellen.

Vergleich der drei Behandlungsgruppen in Bezug auf die Gesamtzellzahl zu drei verschiedenen Zeitpunkten

Um die Immunpathologie in den 3 Gruppen zu vergleichen, wurden die Gesamtzellzahlen im Transplantat betrachtet. Es wurden alle Zellen der verschiedenen Populationen aus allen Bereichen der Kornea zur Gesamtzellzahl addiert. Sie ist erwartungsgemäß jeweils am Tag 17 am größten. Zu diesem Zeitpunkt findet die Abstoßungsreaktion statt.

Zu allen drei Zeitpunkten ist die Zellzahl in der vIL-10-Gruppe etwas geringer als in den anderen Gruppen. Diese Beobachtung weist auf einen immunsuppressiven Effekt durch die vIL-10-Behandlung hin. Allerdings ist der Unterschied in den 3 Gruppen nicht groß genug, um signifikant zu sein; es handelt sich lediglich um eine Tendenz. Ein signifikanter Effekt des vIL-10 lässt sich nur beobachten, wenn man die CD4⁺ T-Zellen isoliert betrachtet.

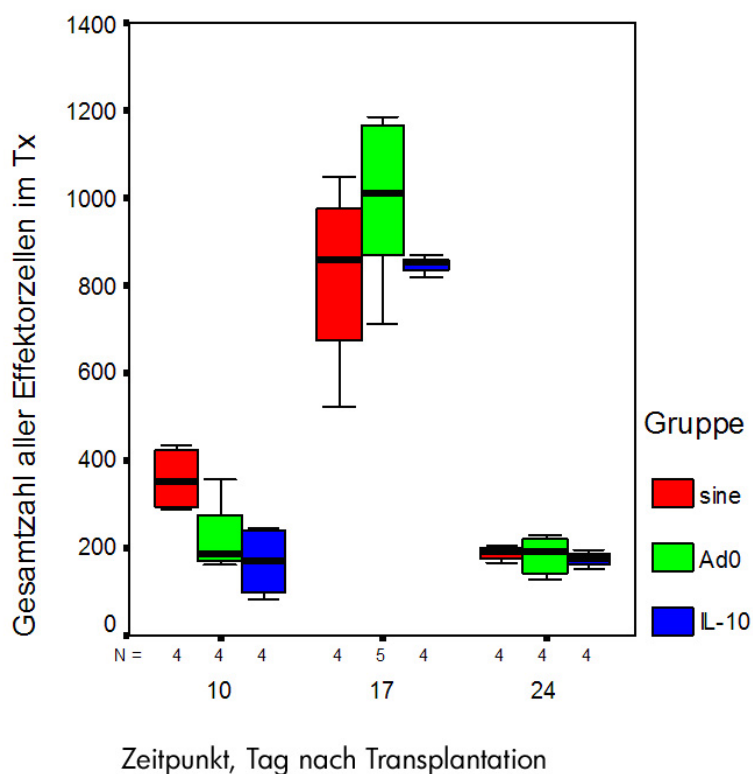


Abb. 22: Grafische Darstellung der Gesamtzellzahl aller Effektorzellen (alle Zellen, die an der Abstoßungsreaktion beteiligt sind und sich durch die verwendeten Ak anfärben lassen). Verglichen wurden die 3 Behandlungsgruppen, also die unbehandelten (sine), die mit Leervektor behandelten (Adv0) und die mit viral induziertem IL-10 behandelten Korneae (IL-10) zu den 3 Zeitpunkten nach Transplantation. Tx = Transplantat, $p > 0,05$.

4.2.2 Die verschiedenen Zellpopulationen

Im Folgenden wird dargestellt, welchen Anteil die einzelne Zellpopulation an der Gesamtzellzahl hat und welche Zellart überwiegt.

Tag 10:

Betrachtet man am Tag 10 das Korneatransplantat und vergleicht die Zellzahl der Subpopulationen, dann fällt auf, dass die Monozyten die stärkste Population darstellen. Nur die CD4+Zellen übertreffen die Monozyten in der sine-Gruppe. Hier wird der oben beschriebene suppressive Effekt von v-IL10 auf die CD4+Zellen – und auch die CD8+Zellen – noch einmal sichtbar. Neben den Monozyten sind auch die CD8+, die CD25+ und die Natürlichen Killerzellen sehr zahlreich. Die CD45+Zellen stellen die kleinste Population dar.

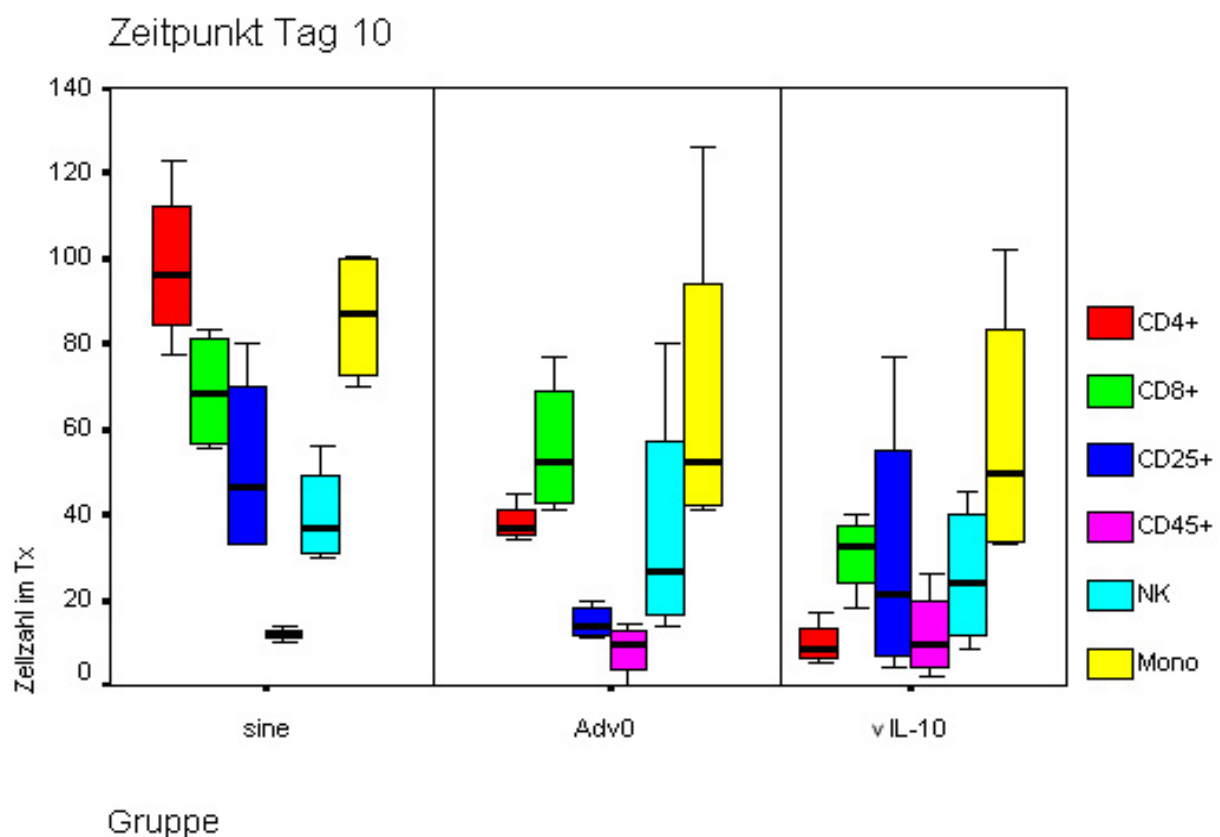


Abb. 23: Grafische Darstellung der **Gesamtzellzahl** der verschiedenen Zellpopulationen, die sich **am Tag 10** nach Transplantation im untersuchten Gewebe darstellen lassen, also CD4+, CD8+, CD25+, CD45+, Natürliche Killerzellen (NK) und Monozyten (Mono). Verglichen wurden die 3 Behandlungsgruppen, also die unbehandelten (sine), die mit Leervektor behandelten (Adv0) und die mit viral induziertem IL-10 behandelten Korneae (vIL-10) bezüglich der jeweils überwiegenden Zellpopulation. Tx = Transplantat, $p > 0,05$.

Tag 17:

Am Tag 17 ist die Entzündungsreaktion am stärksten, und alle Zellpopulationen verzeichnen an diesem Tag wie oben beschrieben ihr Maximum. Die größte Gruppe bilden die Monozyten mit circa 300 bis fast 500 Zellen pro Transplantat. Auch CD8+Zellen und Natürliche Killerzellen lassen sich in großer Zahl anfärben. Hier wird noch einmal die Suppression der CD4+Zellen in der vIL-10-Gruppe deutlich. Die drei Behandlungsgruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Zellzahl.

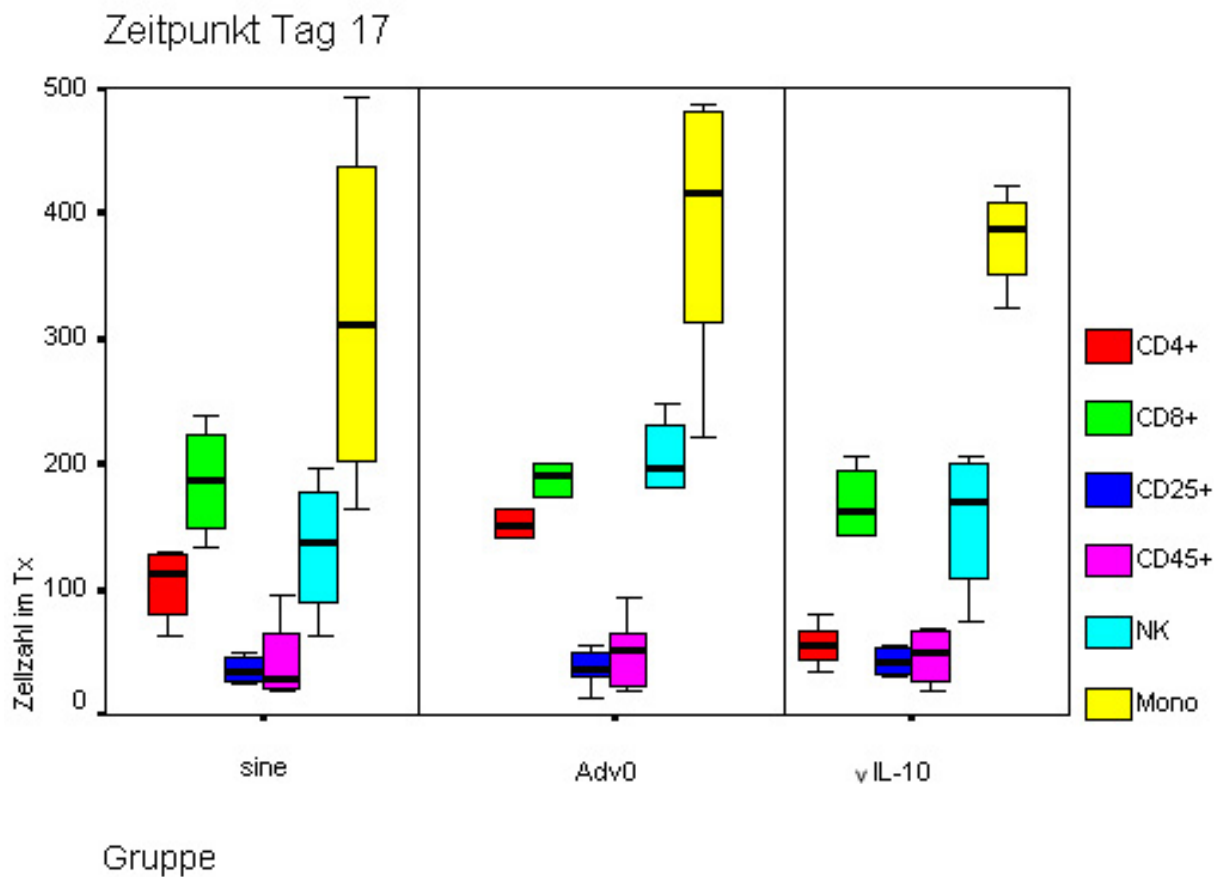


Abb. 24: Grafische Darstellung der **Gesamtzellzahl** der verschiedenen Zellpopulationen, die sich **am Tag 17** nach Transplantation im untersuchten Gewebe darstellen lassen, also CD4+, CD8+, CD25+, CD45+, Natürliche Killerzellen (**NK**) und Monozyten (**Mono**). Verglichen wurden die drei Behandlungsgruppen, also die unbehandelten (sine), die mit Leervektor behandelten (Adv0) und die mit viral induziertem IL-10 behandelten Korneae (vIL-10) bezüglich der jeweils überwiegenderen Zellpopulation.

Tx = Transplantat, $p > 0,05$.

Tag 24:

Weiterhin bilden die Monozyten die stärkste Fraktion. Die NK- und CD8+Zellen sind ebenfalls sehr zahlreich. Zu diesem Zeitpunkt finden sich in allen Gruppen fast keine CD45+Zellen mehr und nur noch ganz vereinzelt CD25+ und CD4+Zellen. Auffällig ist, dass sich die 3 Gruppen in Hinblick auf die Verteilung der Zellarten zuletzt ähneln.

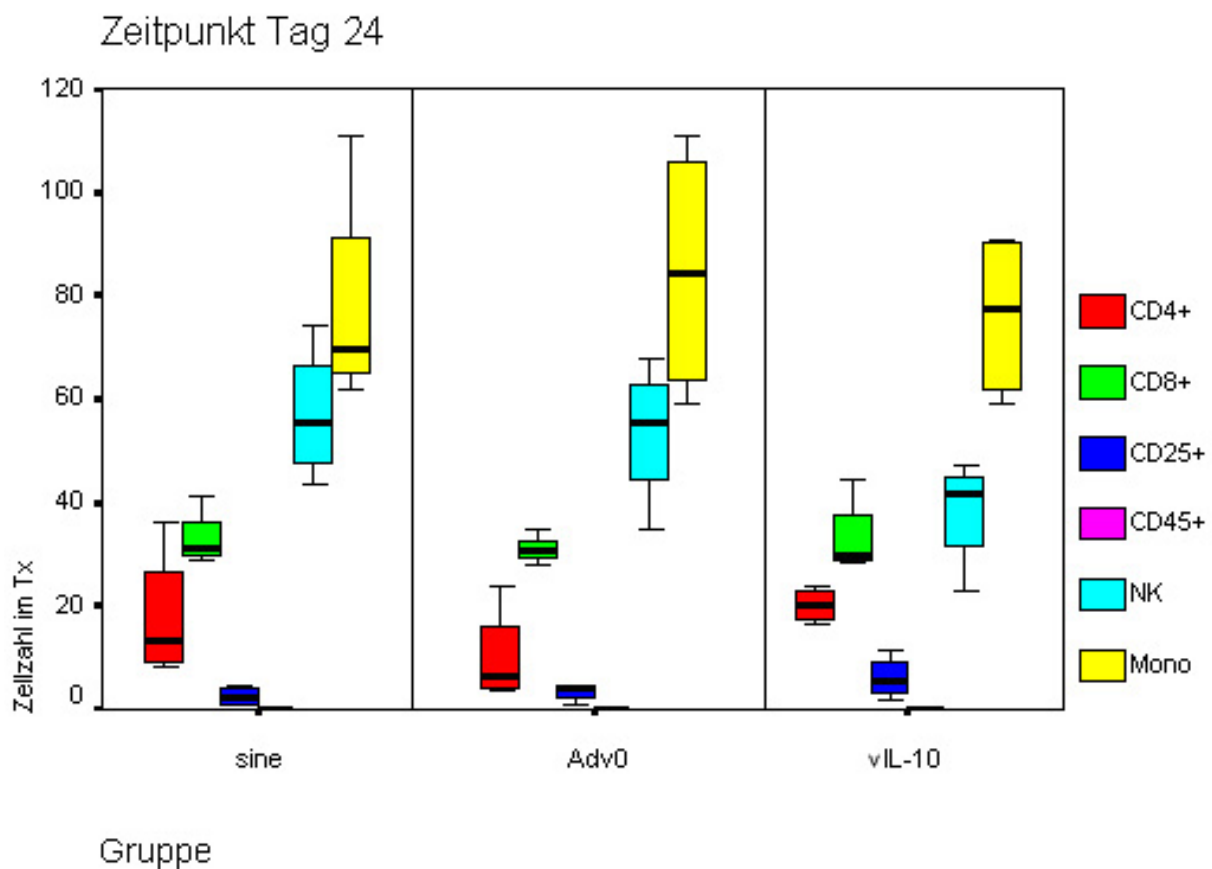


Abb. 25: Grafische Darstellung der **Gesamtzellzahl** der verschiedenen Zellpopulationen, die sich **am Tag 24** nach Transplantation im untersuchten Gewebe darstellen lassen, also CD4+, CD8+, CD25+, CD45+, Natürliche Killerzellen (**NK**) und Monozyten (**Mono**). Verglichen wurden die drei Behandlungsgruppen, die unbehandelten (sine), die mit Leervektor behandelten (Adv0) und die mit viral induziertem IL-10 behandelten Korneae (vIL-10) bezüglich der jeweils überwiegenderen Zellpopulation.

Tx = Transplantat, $p > 0,05$.

4.2.3 Die Verteilung der Entzündungszellen im Transplantat

Das 3,5 mm messende Transplantat wurde mit fortlaufender Naht in die circa 5 mm große Empfängerkernea eingesetzt. In der Immunhistologie wurde die gesamte Kernea gefärbt und untersucht. Dabei war der Faden der Naht teilweise deutlich sichtbar. Es wurden die Zellen im Transplantat, in der Empfängerkernea sowie am Transplantatübergang gezählt.

Es stellte sich heraus, dass sich am Tag 10 bei allen Gruppen die meisten Zellen in der Empfängerkernea befanden, wohingegen das Transplantat selbst nahezu frei von Zellen war.

Am Tag 17 ließen sich die meisten Zellen im Übergangsbereich nachweisen.

Am Tag 24 schließlich waren die Entzündungszellen in das Transplantat immigriert und dort verstärkt nachweisbar — das Transplantat wurde als abgestoßen betrachtet. Dieser Prozess verlief unabhängig von der Art der Behandlung. Im Hinblick auf die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Bereichen der Kernea zu den jeweiligen Zeitpunkten können die drei Behandlungsgruppen also keine signifikanten Unterschiede aufweisen (siehe Abb. 26-28).

Sine-Gruppe:

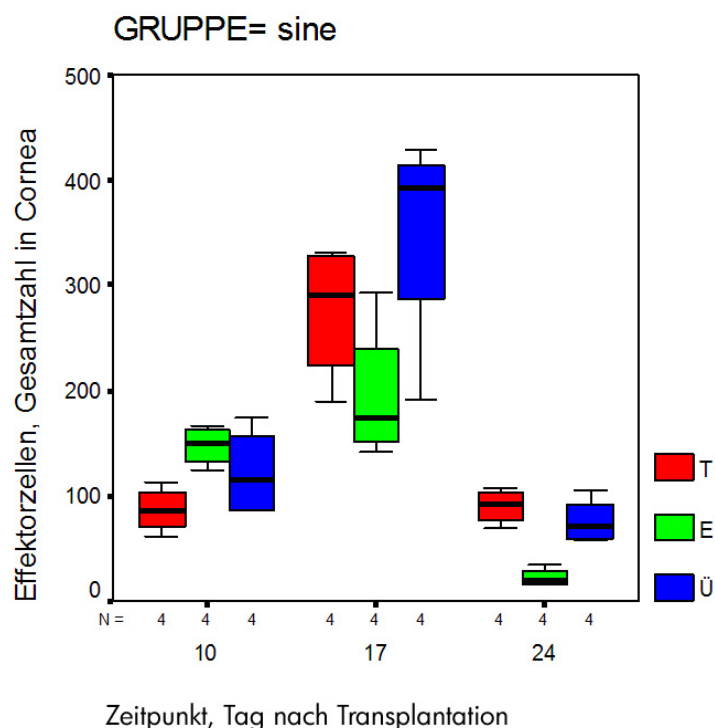


Abb. 26: Grafische Darstellung der Anzahl der an der Entzündung beteiligten Zellen in den verschiedenen Regionen der **unbehandelten** (sine) Kerneae. Verglichen wurden die Zellzahlen in dem Spendertransplantat, der Empfängerhornhaut und dem Übergangsbereich zu den drei Zeitpunkten.

T = Transplantat, E = Empfängerhornhaut, Ü = Übergangsbereich, $p > 0,05$.

Leervektor-Gruppe:

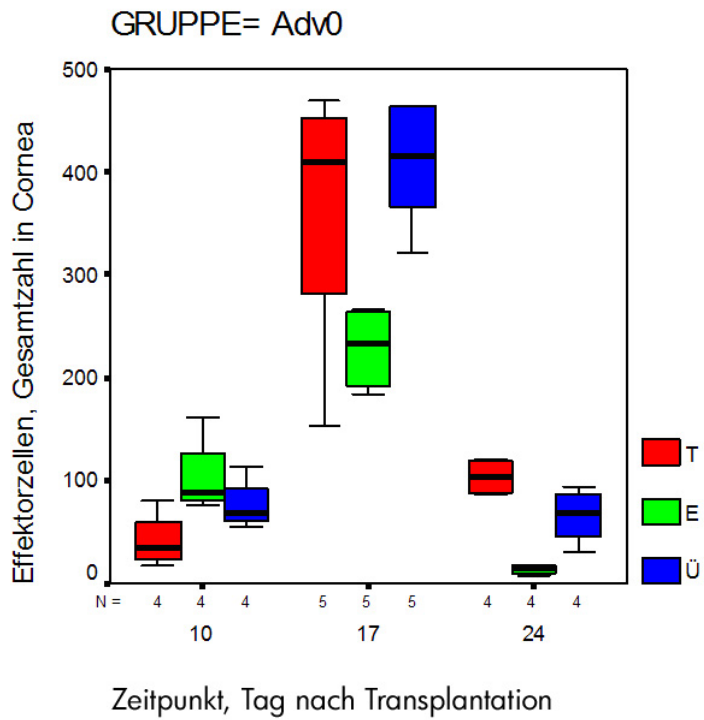


Abb. 27: Grafische Darstellung der Anzahl der an der Entzündung beteiligten Zellen in den verschiedenen Regionen der mit **Adv0** behandelten Korneae. Verglichen wurden die Zellzahlen in dem Spendertransplantat, der Empfängerhornhaut und dem Übergangsbereich zu den drei Zeitpunkten. T = Transplantat, E = Empfängerhornhaut, Ü = Übergangsbereich, $p > 0,05$.

IL-10-Vektor-Gruppe:

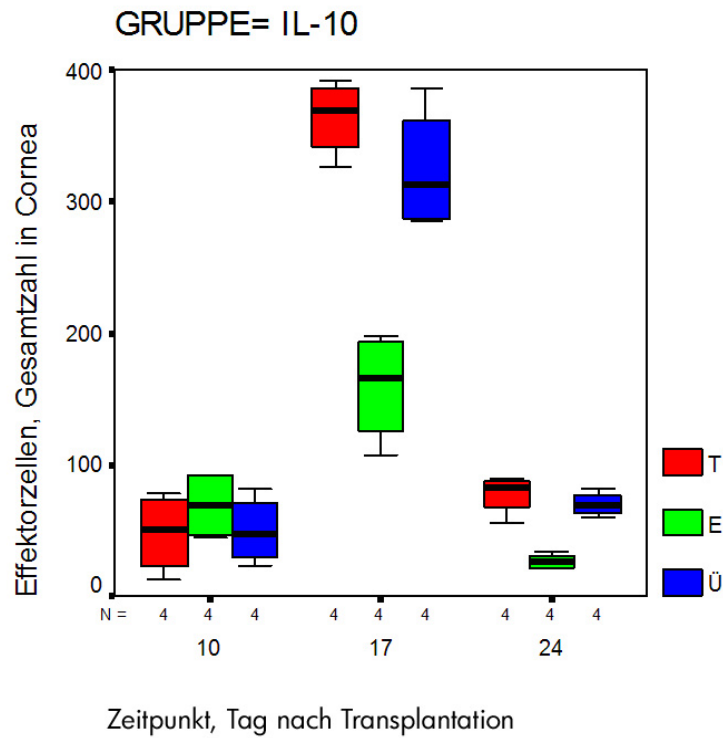


Abb. 28: Grafische Darstellung der Gesamtanzahl der an der Entzündung beteiligten Effektorzellen in den verschiedenen Regionen der mit **vIL-10** behandelten Korneae. Verglichen wurden die Zellzahlen in dem Spendertransplantat, der Empfängerhornhaut und dem Übergangsbereich zu den drei Zeitpunkten. T = Transplantat, E = Empfängerhornhaut, Ü = Übergangsbereich, $p > 0,05$.

5 DISKUSSION

5.1 *Gentransfer bei Keratoplastik*

Das Auge ist ein interessantes Organ für die Gentherapie, weil es durch seine exponierte Lage und Transparenz einen einfachen Zugang und gute visuelle Untersuchungsmöglichkeiten bietet. Dies gilt insbesondere für die Kornea, die sich zudem über längere Zeiträume ex-vivo kultivieren lässt und deren Endothelzellschicht sich für verschiedene Gentransfertechniken eignet.

Allerdings herrscht Mangel an Spenderhornhäuten, und es besteht die Gefahr der prä- und postoperativen Transplantatschädigung. Den bedeutendsten Aspekt der Transplantatschädigung stellt die immunvermittelte Allograftreaktion dar, die bei ca. 30% der Transplantierten auftritt und zu einem Verlust des Transplantats führen kann. Bei Risikopatienten ist die Abstoßungsrate entsprechend höher. Zu den Risikopatienten zählen jüngere Menschen, Patienten mit voroperierten Augen, Neovaskularisation der Wirtshornhaut, sowie Patienten, die Transplantate mit einem Durchmesser von über 8,5 mm erhalten (George et al, 2004; Williams et al, 1997). Der Mangel an Spenderhornhäuten sowie die Häufigkeit solcher Transplantationen erfordern Bemühungen, die Zahl der Abstoßungen weiter zu reduzieren. Eine nichtsystemische Immunmodulation durch beispielsweise Gentherapie ist ein interessanter Ansatz mit dem Ziel, ein geringeres systemisches Nebenwirkungsprofil zu erreichen.

Im Gegensatz zur systemischen oder subkonjunktivalen Verabreichung des rekombinanten Proteins hat der gentherapeutische Ansatz den Vorteil, große Mengen des betreffenden Zytokins über einen längeren Zeitraum lokal zu produzieren.

Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass die adenovirale Transduktion von Herztransplantaten mit vIL-10 nicht nur zu einem verlängerten Transplantatüberleben führte, sondern auch die unerwünschte virusspezifische Immunantwort hemmte, was die Persistenz des Vektors verbesserte (Qin et al., 1997). Diese Beobachtung könnte vor dem Hintergrund der Korneatransplantation von besonderem Interesse sein. Es konnte gezeigt werden, dass der Gentransfer von IL-10 in verschiedenen Transplantationsmodellen einschließlich der Kornea zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens führte (Comer et al., 2002; Thiel et al., 2005; Verwaerde, et al., 2003.)

Der besondere Vorteil beim Einsatz von Retroviren und Adenoviren besteht in der höheren Transduktionseffizienz als dies bei Liposomen oder Elektroporation der Fall ist (Ritter et al., 2005).

Dabei darf aber nicht unterschätzt werden, dass es möglicherweise auch zu einer Überdosierung der adenoviralen Partikel und einer daraus resultierenden Entzündung oder dysregulierten Proliferation der transduzierten Zellen kommen kann. Somit ergeben sich Anforderungen an die Gentherapie, die darin bestehen, dass die Genexpression über einen beschränkten Zeitraum und in einem gewünschten Ausmaß ausschließlich im Zielgewebe realisiert werden kann.

Häufig kommt es zu einer unerwünscht kurzen Genexpression, weil es durch den episomalen Status des Gens während der Zellteilung zu einem Genverlust kommen kann (Ritter et al., 2005). Da rekombinante Adenoviren eine Transduktionseffizienz vorwiegend beim Endothel – und nicht im Epithel oder Stroma – aufweisen und das humane Endothel kaum über die Fähigkeit zur Zellteilung verfügt, stellt dieser beim Menschen nicht den limitierenden Faktor dar. Das Endothel von Ratte und Schaf verfügt jedoch über die Fähigkeit zur Regeneration, weshalb Genverlust durch Zellteilung in unserem Modell möglicherweise eine Rolle spielt.

Die bisher untersuchten Modelle mit adenoviralem Gentransfer zur Vermeidung der Korneatransplantatabstoßung waren noch nicht sehr erfolgreich. Eine Ausnahme bildet jedoch die Anwendung von vIL-10 im Schafmodell (Klebe et al., 2001). Bevor die Gentherapie zu einer Erfolg versprechenden therapeutischen Option in der Transplantationsmedizin avancieren kann, müssten die Vektoren verbessert und ihre Immunogenität vermindert, die Promotoren (beispielsweise nichtvirale) weiterentwickelt, Transgene optimiert, respektive die besten therapeutischen Gene gefunden werden.

5.2 Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob eine lokale Überexpression des immunmodulatorischen Zytokins vIL-10 in kornealen Transplantaten zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit führen kann.

Zwar konnte ex-vivo eine hohe und lang anhaltende Zytokinexpression erzielt werden, eine signifikante Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit gelang jedoch nicht. In der Immunhistologie konnte nur eine geringfügige Beeinflussung der Immunreaktionen durch den adenoviralen Gentransfer von vIL-10 festgestellt werden.

Ein Problem stellt die geringe Zahl an Versuchstieren dar – es gab 37 Empfängertiere. So ist es schwierig, signifikante Ergebnisse zu erzielen.

Hinzu kommt, dass es sich beim angewandten Modell um ein „starkes Abstoßungsmodell“ mit komplettem Mismatch der MHC I/II und mehrerer Minor-Antigene handelt. Zudem

verfügt die Ratte über ein sehr effizientes und hochaktives Immunsystem. Dies sind Faktoren, die eine Transplantatabstoßung begünstigen.

Die lokale Applikation

Etliche Arbeiten belegen die Fähigkeit adenoviraler Vektoren, das korneale Endothel verschiedener Spezies effektiv transduzieren zu können (Borras et al., 1996; Budenz et al., 1995; Larkin et al., 1996b; Oral et al., 1997; Ritter et al., 1999b).

Der Hauptvorteil des Gentransfs im Vergleich zur exogenen Zytokinapplikation mit kurzer Halbwertszeit und der damit verbundenen begrenzten Bioverfügbarkeit liegt in der kontinuierlichen Sekretion im transplantierten Organ (Ma et al., 1996). Zudem minimiert man die Nebenwirkungen, die bei systemischer Applikation zu beobachten sind. Es ist bekannt, dass diese Vektoren bei systemischer Anwendung toxische Effekte haben oder eine Immunantwort auslösen können (Kay et al., 2001b).

Larkin et al. (1996) konnten nachweisen, dass der adenovirale Gentransfer auf das korneale Endothel beschränkt ist und dass das Reporter-gen ex-vivo über einen längeren Zeitraum exprimiert wird. Das Epithel wird durch den Empfänger ersetzt und stellt kein Ziel der Genterapie dar. Anzustreben ist also die lokale Applikation, die das Endothel effizient zu transduzieren in der Lage ist. Die Endothelzellen sind langlebig, was der kontinuierlichen Sekretion des Proteins entgegenkommen müsste.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt des adenoviral vermittelten Gentransfers von vIL-10 in die Kornea vor der Transplantation untersucht. Die ex-vivo-Herangehensweise sollte das immunmodulatorische Zytokin zwar effizient in das Transplantat transferieren, aber gleichzeitig die Immunantwort gegen die adenoviral transduzierten Zellen minimieren. Zur Sicherstellung einer ausreichenden Zytokinproduktion wurde das Medium über der Kornea zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gentransfer ex-vivo vor Transplantation mittels ELISA analysiert. Die höchste Konzentration von vIL-10 ließ sich nach 48 h mit 50 ng/ml nachweisen. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits 24 Stunden nach Applikation von AdrIL-4 an ex-vivo kultivierten Hornhäuten signifikante Konzentrationen von IL-4 im Überstand detektierbar sind (Ritter et al., 1999a). Zusätzlich wurde der Nachweis erbracht, dass unter den gewählten Bedingungen die Expression des therapeutischen Gens über mehr als 6 Tage erhalten bleibt (Ritter et al., 1999a).

Die ex-vivo-Verabreichung von IL-10 durch rekombinante Adenoviren wurde bereits in verschiedenen experimentellen Modellen für die Transplantation praktiziert. Dabei wurden mit Blick auf das Transplantatüberleben kontroverse Ergebnisse erzielt. Positive Effekte

wurden in Modellen der Herz- und Lungentransplantation beobachtet (Zuo et al. 2001; Boehler et al., 1998). Allerdings erfordert die Mehrzahl der Modelle, die sich mit Verhinderung der Hornhautabstoßung beschäftigen, eine systemische Expression des therapeutischen Proteins (Comer et al., 2002; Gong et al., 2006), wohingegen wenige Berichte erfolgreicher Transplantationen in Modellen mit lokalem Gentransfer publiziert wurden (Klebe et al., 2001 et 2005; König Merediz et al., 2000).

Bei Ratten, die eine systemische AdvIL-10-Gentransferbehandlung vor der Transplantation in Form einer intraperitonealen Applikation erhielten, verlängerte sich das Transplantatüberleben signifikant verglichen mit der Kontroll-Gruppe (Gong et al., 2007).

Ein im Vergleich zur Kontroll-Gruppe verlängertes Transplantatüberleben zeigt sich auch bei der systemischen Anwendung von AdCTLA4Ig (Gong et al., 2006).

Die Prävention der Hornhautabstoßung durch lokalen Gentransfer scheint jedoch weniger erfolgreich zu sein als es in anderen Organen beschrieben wurde. Ob unterschiedliche Abstoßungskinetiken oder unterschiedliche Expressionen der therapeutischen Gene hierfür ursächlich sind, bleibt unklar.

Die Th1-Antwort

Das Modell der Keratoplastik im Nagetier zeichnet sich durch viele Gemeinsamkeiten mit der Situation beim Menschen aus und erlaubt Einsichten in die Immunpathologie der Hornhautabstoßung sowie neue Behandlungsansätze. Untersuchungen im Tiermodell konnten die bedeutende Rolle von T-Lymphozyten bei der Abstoßung kornealer Transplantate belegen (Pleyer et al., 1995d).

Die verschiedenen Untergruppen der T-Zellen sind bekannt; insbesondere die Bedeutung der CD4⁺ Zellen (He et al., 1991; Pleyer et al., 1995). So nehmen vor allem die CD4⁺ T-Zellen, die sich aufgrund ihrer Zytokinsekretion in unterschiedliche T-Helfer Subpopulationen, wie Th0-, Th1-, Th2-, Th3- und Th4-Zellen, unterteilen lassen, Einfluss auf den Verlauf von Abstoßungsreaktionen. Die Interaktion der T-Zellen und die Identifikation ihrer spezifischen Untergruppen fokussierte die Aufmerksamkeit auf regulatorische Zytokine (Yamada et al., 1999).

Die Analyse von Th1- und Th2-Zytokinprofilen transplantiertter Organe erlaubt Rückschlüsse auf die Immunbiologie des transplantierten Organs. Zellen, die abgestoßene Hornhauttransplantate infiltrierten, gehören, ihrem Zytokinmuster nach zu urteilen, dem Th1-Typus an (Torres et al., 1996; Sano et al., 1998). Bei der Abstoßung von Hornhauttransplantaten konnte von Torres et al. (1996) IL-2- und IFN- γ -mRNA

nachgewiesen werden, was die dominante Rolle der Th1-Zytokine für die Transplantatabstoßung belegt. Darüber hinaus zeigten Kammerwasseranalysen in Bezug auf die Proteine und die mRNA ein ähnliches Muster (Yamagami et al., 1998). Auch Yamada et al. (1999) konnten diese Zytokine im Kammerwasser sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisen. Eine Hemmung der Th1-Antworten ist deshalb von besonderem Interesse für die Modulation der Immunreaktion gegen korneale Transplantate.

Während die Expression von Th1-Zytokinen (IL-2, IFN- γ) im Zusammenhang mit Abstoßungsreaktionen gesehen wird (Dallman, 1993), scheinen Th2-Antworten keinen schädigenden Einfluss auf das Transplantat auszuüben. Vorangegangene Untersuchungen der Zytokinexpressionsmuster nach Keratoplastik zeigen, dass dies auch für die Kornea gilt (Sano et al., 1998b; Torres et al., 1996; Yamagami et al., 1998b).

Zudem wirken Th1- und Th2-Zytokine als Wachstumsfaktoren für die jeweilige Zellpopulation und gleichzeitig als Inhibitoren auf den anderen Zelltyp (Gajewski et Fitch, 1988).

Aus diesem Grund wurden immunmodulatorische Th2-Zytokine, zu denen auch IL-10 gehört, in verschiedenen Transplantationsmodellen eingesetzt, allerdings mit unterschiedlichem Erfolg. Auch bei Gong et al. (2007) führte der lokale AdvIL-10-Gentransfer in Rattenhornhäuten nicht zur Verlängerung des Transplantatüberlebens verglichen mit der Kontrollgruppe. Ähnliche Resultate bezüglich Hornhauttransplantatüberleben wurden bei Verwendung von AdvIL-4, einem anderen antientzündlichen Zytokin, das die T2-Zellen induziert, beobachtet (Pleyer et al., 2000).

Es gab erfolgreiche Versuche, in denen die Verhinderung der Abstoßung allogener Transplantate mittels Applikation des CTLA4Ig-Proteins gelang, welches die CD28-B7-Interaktion hemmt (Lenschow et al., 1996; Guillot et al., 2000; Ardjomand et al., 2003; Schaub et al., 1998). In einer weiteren Untersuchung war das Transplantatüberleben bei den Ratten, die ex-vivo AdCTLA4Ig transduzierte Korneas erhielten, im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen signifikant verlängert. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit ausschließlich AdCTLA4Ig- und der mit AdvIL-10/AdCTLA4Ig-vermitteltem Gentransfer bezüglich der Überlebenszeit (Gong et al., 2006).

Virales und zelluläres IL-10

Es sollte untersucht werden, ob der Gentransfer von adenoviralem vIL-10 zu einem signifikant verlängerten Transplantatüberleben im Modell MHC I/II disparater Ratten führt,

nachdem unter anderem adenoviral vermittelter Gentransfer von Ratten-IL-4 in diesem Modell keinen solchen Effekt zeigte (Pleyer et al., 2000).

Gentransfer von IL-10 in Allotransplantationsmodellen hemmt die Antigenpräsentation und die Entzündungsreaktion. Im Gegensatz zu zellulärem IL-10 zeigt das Epstein-Barr-Virus-kodierte Homolog nur diese immunsuppressiven Eigenschaften, ohne jedoch Natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen zu stimulieren (Qin et al., 1997c). Aus diesem Grund ist vIL-10 als wirkungsvoller anzusehen.

Genutzt und nachgewiesen wurde dies bereits in Modellen von Herz- (David et al., 2000; Guillot et al., 1999; Ke et al., 2000; Qin et al., 1997b; Zuo et al., 2001) und Nierentransplantationen (Kato et al., 2000; Yang et al., 2003) sowie bei der Keratoplastik (Klebe et al., 2001; Pleyer et al., 2000b). Bei der Keratoplastik gelang es Klebe et al. (2001) im Schafsmodell, ein verlängertes Überleben vIL-10 transduzierter Hornhauttransplantate zu erzielen. Allerdings ist hier anzumerken, dass die Aussagekraft durch die kleine Fallzahl eingeschränkt wird. In der Verumgruppe mit 9 Tieren kam es bei 4 Tieren zur Abstoßungsreaktion, deren Ausmaß und Zeitpunkt mit der Reaktion bei den Kontrolltieren vergleichbar waren. Bei 3 Tieren war das Transplantatüberleben verlängert und bei 2 Tieren zeigte sich ein Langzeitüberleben. Dies war maßgeblich für das signifikant längere Transplantatüberleben der Tiere der Verumgruppe.

Auch verschiedene andere Studien konnten zeigen, dass IL-10 das Transplantatüberleben verlängern kann. Die verlängerte Überlebenszeit von transplantierten Herzen war assoziiert mit einer hohen Expression von IL-4 und IL-10 (Mottram et al., 1995).

Bacchetta et al. zeigten die Korrelation zwischen der IL-10-Produktion und der Toleranzinduktion in Patienten, die eine hämatopoetische Stammzelltransplantation mit MHC-Mismatch erhielten (Bacchetta et al., 1994). Darüber hinaus deuten Studien mit IL-10-knock-out-Mäusen darauf hin, dass der Ausfall von IL-10 zu einer verstärkten Transplantatabstoßung führt (Raisanen-Sokolowski et al., 1998).

Andererseits konnte eine Abstoßung nicht verhindert werden, indem diabetischen Mäusen Pankreasinseln transplantiert wurden, die mit AdvIL-10 transduziert wurden (Smith et al., 1997).

Auch die Studie von Torres et al., in der die Injektion von rekombinantem murinen IL-10 im Rattenmodell entweder subkonjunktival oder intraperitoneal und aber auch kombiniert erfolgte, konnte keine Verlängerung des Transplantatüberlebens verzeichnen (Torres et al., 1999). Als Ursachen für den mangelnden Effekt von IL-10 in Bezug auf das

Transplantatüberleben könnten die unzureichende Menge des rekombinanten Proteins und die kurze Halbwertszeit bei einer systemischen Applikation diskutiert werden.

Zahlreiche Studien dokumentieren eine Korrelation zwischen der IL-10-Expression und der Transplantatabstoßung. Die akute Nierenabstoßung war assoziiert mit Expression von IL-10 und ebenso mit der in-vivo-Produktion der Th-1-Zytokine IL-2, IFN- γ , TGF- β 1 und IL-7 (Merville et al., 1993; und 1995). Die transgene IL-10-Expression in den β -Zellen des Pankreas zeigte eine Assoziation verstärkter Infiltration mit Entzündungszellen, während ein hohes Level an IL-10-mRNA-Expression mit der Abstoßung von Pankreas-Inselzell-Transplantaten im Mausmodell korrelierte (Lee et al., 1994). Die Expression von IL-10-mRNA in abgestoßenen Korneatransplantaten ist höher als in den vom Wirt akzeptierten Hornhäuten (Torres et al., 1996). Torres et al. sehen daher einen weiteren Ansatz in der Inhibition von IL-10 in einem Modell der kornealen Allogtransplantation.

Auch wenn es in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen ist, das Überleben von Hornhauttransplantaten durch ex-vivo-Gentransduktion zu verlängern, scheint gemäß anderer Arbeiten die Kornea der Immunmodulation durch Genterapie mit potentieller Nutzung adenoviraler Vektoren zugänglich.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um einschätzen zu können, ob sich IL-10 als therapeutischer Ansatz in der Korneatransplantation bewähren wird und um ein besseres Verständnis dieser Zytokine unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu erlangen. Zu erwägen sind beispielsweise andere Interleukine oder Plasmide.

Der Einsatz von IL-4 ermöglichte ein verlängertes Überleben in Haut-, Nieren- und Herztransplantationsmodellen (He et al., 1998a; Mottram et al., 1995; Takeuchi et al., 1997b). Dabei führte sowohl die lokale Überexpression, als auch eine systemische Applikation von IL-4 zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens (He et al., 1998b; Takeuchi et al., 1997a). Auch war ein Synergie-Effekt von IL-4 und IL-10 im Nierentransplantationsmodell der Ratte bei der Verlängerung der Transplantatakzeptanz nachweisbar – und dies interessanterweise, nachdem in diesem starken Abstoßungsmodell (WF auf Lew) IL-4 allein keinen Effekt erzielt hatte (Kato et al., 1999). Im Keratoplastikmodell konnte nach Übertragung des IL-4-Gens mit adenoviralen Vektoren im gleichen Rattenmodell (WF auf Lew) ebenfalls keine Verlängerung des Transplantatüberlebens erzielt werden (Pleyer et al., 2000a). Ritter et al. zeigten, dass IL-4 weder ausreichend noch notwendig für die Toleranzinduktion in Herztransplantationsmodellen ist (Ritter et al., 1999a). Der Grund dafür ist unklar.

Inaktivierung des viralen Promotors durch Zytokine

Im Korneatransplantationsmodell des Kaninchens mit adenoviral transferiertem Gen war das betreffende Protein ab Tag 4 nicht mehr nachweisbar (Larkin et al., 1996). Ähnliche Erkenntnisse wurden bei anderen Geweben wie den Fibroblasten des Hauttransplantats gewonnen. Möglicherweise ist dies auf die Beendigung der Genexpression nach Ausschaltung des Promotors zurückzuführen (Palmer et al., 1991). Wahrscheinlich tritt in-vivo eine Inaktivierung des viralen Promotors durch Zytokine auf. Es ist anzunehmen, dass unter anderem proinflammatorische Zytokine an der schnellen Suppression des therapeutischen Gens beteiligt sind (Qin et al., 1997a; Ritter et al., 2000; Stein et al., 1993; Sung et al., 2001). Qin et al. konnten diesen Effekt für die Zytokine IFN- γ und TNF- α nachweisen, die durch die ausgelöste Immunreaktion verstärkt gebildet wurden und sich gegen virale Promotoren richteten.

Eine Suppression des therapeutischen Gens wäre durch eine Inaktivierung des Promotors denkbar. Gong et al. (2006) vermuten als Ursache hierfür augenspezifische Inhibitoren, die die viralen Vektoren in ihrer Regulation durch Beeinflussung des Cytomegalieviruspromotors stören. Möglicherweise könnte die Expression antiinflammatorischer oder Th2-Zytokine wie IL-10 diesen Effekt verhindern. Eine wirkungsvolle Alternative wäre auch die Verwendung nichtviraler Promotoren, die vermutlich nicht durch Zytokine inaktiviert würden.

Der Einfluss von Dosis und Zeit

Überdies spielt die Dosis des Zytokins (David et al., 1997) eine wichtige Rolle. Dass die Wirkung von IL-10 und vIL-10 dosis- und zeitabhängig zu sein scheint, vermuten Blazar et al. (1998).

Eine effiziente Gentherapie bedarf der Kontinuität der Expression des therapeutischen Gens. Obwohl gezeigt wurde, dass ex-vivo transduzierte Korneae das therapeutische Gen für eine gewisse Zeit exprimieren, scheint die transgene Expression in-vivo nach ein paar Tagen abzuklingen. Es gibt in-vivo-Untersuchungen, die zeigen, dass bereits 4 Tage nach Transplantation transduzierter Hornhäute keine Expression mehr nachweisbar ist (Larkin et al., 1996a).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Expression des therapeutischen Gens zu hoch oder zu gering ist und dadurch ein gegenteiliger Effekt erzielt wird.

Es könnte beispielsweise zusätzlich eine präoperative lokale IL-10-Applikation erwogen werden, um eine möglichst frühe Immunmodulation zu induzieren. Die Proteinsynthese

(durch das transduzierte Endothel) benötigt mindestens 6 Stunden, so dass direkt postoperativ eine therapeutische Lücke entsteht.

Hier könnten neue Ansätze greifen, die auch eine lokale Applikation des Vektors bereits vor Transplantation ermöglichen. Im Fall der Keratoplastik könnte dies beispielsweise eine Injektion des Vektors in die Augenvorderkammer oder den Glaskörper des Auges sein (Abraham et al., 1995).

Womöglich ist gar keine Langzeitgenexpression erforderlich und es genügt die Induktion der Immunmodulation, um die Kaskade der Immunantwort schon ab Beginn zu hemmen.

Die meisten Transplantatabstoßungen werden in den ersten postoperativen Monaten beobachtet, im späteren Verlauf sind sie seltener. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass in den ersten beiden postoperativen Monaten die Lymphozyten in der Lage sind, aus Limbus- und Hornhautgefäßen durch das fibröse Gewebe der Wirt-Spender-Grenze und durch die noch nicht geschlossene Descemetische Membran auf das Endothel zu wandern. Hat sich dann eine kontinuierliche Descemetische Membran gebildet und ist die Wirt-Spender-Narbe fest genug geworden, ist dieser Weg den immunkompetenten Zellen versperrt (Sundmacher, 1977). Ein weiterer Grund für seltene Transplantatabstoßungen zu späteren Zeitpunkten ist in der relativen Toleranzinduktion zu sehen.

Eine Langzeitgenexpression in-vitro bedeutet zudem keine Langzeitgenexpression in-vivo. Ein Zelluntergang oder das Abschalten der betreffenden Gene können ursächlich sein. Adenovirale Proteine, die in den transduzierten Zellen in geringer Menge exprimiert werden oder toxische adenovirale Kapsidproteine, die unbeabsichtigt mit in die Zielzelle eindringen, könnten Apoptose triggern und zum Zellverlust beim Endothel führen (Ritter et al., 2005).

Den Einfluss der Dosis diskutierten auch Torres et al., die nach der Injektion von rekombinantem murinen IL-10 im Rattenmodell keine Verlängerung des Transplantatüberlebens beobachten konnten (Torres et al., 1999). Die Applikation erfolgte sowohl subkonjunktival oder intraperitoneal als auch kombiniert sowie in variierten Dosen. Subkonjunktival erfolgte die Injektion am Tag der Transplantation sowie am 2., 4., 6., 8. und 10. postoperativen Tag (in 3 Behandlungsgruppen) mit der Dosis von 0,5 ng, 5,0 ng oder 50 ng. Intraperitoneal wurde 1 µg ein Tag vor der sowie am Tag der Transplantation und dann jeweils am 2., 4., und 6. Tag nach Transplantation injiziert und in einer Gruppe mit der subkonjunktivalen Verabreichung von 5,0 ng kombiniert. Weder die lokale noch die systemische oder die kombinierte Applikation verlängerten das Transplantatüberleben signifikant – unabhängig von der Dosis. Andere Dosen oder Applikationsformen könnten diskutiert werden.

Interessanterweise verlängerte eine Hochdosistherapie mit AdvIL-10 das Transplantatüberleben nicht (Gong et al., 2007). Bei diesen Ratten ließ sich das IL-10-Protein im Gegensatz zur Normaldosis-Gruppe gar nicht nachweisen.

Die antiapoptischen Eigenschaften von Ad0

Der Einsatz des Kontrollvektors Ad0 führte zu einer längeren Transplantatüberlebenszeit als der therapeutische Vektor. Ad0 ist als geeigneter Kontrollvektor anzusehen, da er als Leervektor nur adenovirale Bestandteile ohne ein zusätzlich inseriertes Gen enthält. Allerdings scheint er antiapoptische Eigenschaften zu besitzen. Dies könnte auf die E3-Region zurückzuführen sein. Die E3-Region kodiert Proteine, die die Antigenpräsentation auf infizierten Zellen und die zytokininduzierte Apoptose dieser Zellen verhindern (Wold und Gooding, 1991). So konnte im Mausmodell das Überleben von Inselzell-Transplantaten verlängert werden, deren β -Zellen E3-Gene exprimierten (Efrat et al., 1995).

Bei dem in diesen Versuchen eingesetzten adenoviralen therapeutischen IL-10-Vektor handelte es sich dagegen um einen E1/E3-deletierten Vektor. Dies könnte also ein Grund dafür sein, weshalb die Abstoßungsreaktion in der Ad0-Gruppe schwächer war als in der vIL-10-Gruppe.

Die Immunreaktion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Anteil die einzelne Zellpopulation an der Gesamtzellzahl hatte und welche Zellart zu welchem Zeitpunkt überwog.

Bereits vor der Abstoßung (Tag 10) stellten die Monozyten die stärkste Zellpopulation dar. Nur die Zahl der CD4⁺Zellen übertraf die der Monozyten in der sine-Gruppe. Neben den Monozyten waren auch die CD8⁺, die CD25⁺ und die Natürlichen Killerzellen recht zahlreich. Die CD45⁺Zellen stellten die kleinste Population dar.

Zum Zeitpunkt der Abstoßung (circa Tag 17 nach Transplantation) war die Entzündungsreaktion am stärksten und alle Zellpopulationen verzeichneten an diesem Tag ihr Maximum. Die größte Gruppe bildeten wiederum die Monozyten. Auch CD8⁺Zellen und Natürliche Killerzellen ließen sich zahlreich nachweisen.

Die Monozyten bildeten auch noch nach abgelaufener Abstoßungsreaktion (Tag 24) die stärkste Fraktion. Die NK- und CD8⁺ Zellen waren ebenfalls in großer Menge nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich in allen Gruppen fast keine CD45⁺ Zellen mehr und nur noch ganz vereinzelt CD25⁺ und wenige CD4⁺ Zellen. Auffällig war, wie sich die drei Gruppen bezüglich der Verteilung der Zellarten ähnelten.

Vergleichbare Beobachtungen machten auch Nicholls et al. bei ihren Untersuchungen zum Verteilungsmuster der Entzündungszellen im Korneatransplantat am Modell der Ratte (Nicholls et al., 2006). Allerdings wurden die Transplantate nicht zu einem vorher festgelegten Zeitpunkt, sondern während der durch klinische Untersuchung an der Spaltlampe festgestellten Abstoßungsreaktion entnommen. Hier wurde die Abstoßung um die postoperativen Tage 10 bis 15 beobachtet.

Gong et al. (2007) stellten fest, dass sich durch lokale AdvIL-10-Applikation lediglich eine leicht reduzierte Infiltration von Entzündungszellen wie CD3+ und CD25+Zellen in Spenderhornhäuten nachweisen ließ.

Die Analyse des mRNA-Expressionsprofils von Spenderhornhäuten bei AdCTLA4Ig-Behandlung zeigte ein deutlich reduziertes Expressionsmuster der Entzündungs- und Infiltrationsmarker, ähnlich nicht transplantierten Korneae (Gong et al., 2006). Je ausgeprägter die Immunreaktion war, desto höher war der Gehalt an mRNA-Molekülen von CD3+ und CD25+Zellen, IFN- γ und TNF- α .

Die antivirale Immunisierung

Bekanntermaßen können adenovirale Vektoren sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort gegen den Vektor und die transduzierten Zellen induzieren, was den Erfolg der adenoviral vermittelten Gentherapie limitieren dürfte (Yang et al., 1995; Kay et al., 2001; Ritter et al., 2002).

Die systemische Applikation von AdvIL-10 konnte die Bildung von antiadenoviralen Antikörpern nicht verhindern; es fand eine Immunisierung gegen den Vektor statt (Gong et al., 2007). So waren im Serum der systemisch mit AdvIL-10 behandelten Ratten antiadenovirale Antikörper nachweisbar, jedoch interessanterweise in signifikant geringerer Konzentration als bei der Leervektor-Kontrollgruppe oder in der Hochdosis-AdvIL-10-Gruppe. Das therapeutische AdvIL-10-Protein selbst ließ sich im Serum der behandelten Tiere nicht mehr nachweisen.

Im Gegensatz dazu war im Modell mit AdCTLA4Ig-Applikation die antivirale Immunantwort bei allen vermindert, selbst bei Ratten, die CTLA4Ig nicht auf therapeutischem Level exprimierten (Gong et al., 2006). Dass die systemische CTLA4Ig-Proteinexpression die Bildung von antiviralen Antikörpern effektiv zu verhindern scheint, eröffnet die Möglichkeiten einer wiederholten Applikation, falls nötig.

Die Rolle der Lymphknoten

Die regionalen Lymphknoten spielen eine essenzielle Rolle bei der Abstoßungsreaktion. Ling et al. (2005) konnten im Modell der Ratten beweisen, dass die ipsilaterale Lymphadenektomie die allogene Korneatransplantatabstoßung signifikant hemmt. Bei bilateraler Lymphadenektomie verlängerte sich im Vergleich zur ipsilateralen Lymphadenektomie das Transplantatüberleben nicht zusätzlich.

Weshalb ist der weniger invasive Ansatz mit Erhalt der Lymphknoten nun weniger effektiv? Es besteht die Möglichkeit, dass die lokale, auf das Transplantat begrenzte Genexpression von vIL-10 nicht genügt, um die immunologische Aktivierung der T-Zellen in den regionalen Lymphknoten zu verhindern. Eine signifikante Veränderung des mRNA-Expressionsprofils in den drainierenden Lymphknoten konnten auch Gong et al. (2007) nicht beobachten. Lokaler IL-10-Gentransfer führte nicht zu einer Modulation der Entzündungsreaktion in den drainierenden Lymphknoten, wo die betreffende Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung stattfindet.

Wahrscheinlich gelangt das therapeutische Genprodukt von der transduzierten Kornea nicht in die regionalen Lymphknoten, was möglicherweise eine Voraussetzung für eine Immunmodulation ist, denn die allogene Immunantwort wird nicht nur im transplantierten Organ, sondern auch in den Lymphorganen initiiert.

Boisgerault (Boisgerault et al., 2001) konnte die kritische Rolle der drainierenden Lymphknoten bei der Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen belegen. Diese T-Zell-Aktivierung muss also verhindert werden, um ein Transplantatüberleben erreichen zu können. Die Übertragung immunregulatorischer Moleküle in korneale Transplantate ohne eine Manipulation der drainierenden Lymphknoten ist also wahrscheinlich nicht ausreichend für die Vermeidung des Abstoßungsprozesses.

In der vorliegenden Studie konnte durch die Expression von vIL-10 die frühe Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Transplantat verringert werden. Dieser Effekt war jedoch nur von kurzer Dauer und konnte die Transplantatüberlebenszeit nicht entscheidend beeinflussen. Die Modifikation der Reaktion in den drainierenden Lymphknoten könnte ein wichtiger Schritt zu einem verbesserten Transplantationsergebnis sein. Auch Gong et al. (2007) vermuten, dass für die Manipulation des Immunsystems zum Ziel der Abstoßungsprävention - beispielsweise durch antientzündliche Zytokine - eine Immunmodulation in den Lymphknoten erforderlich sein könnten, wohingegen diese im Transplantat selbst weniger wichtig zu sein scheint.

5.3 *Fazit und Ausblick*

Die Immunpathologie der Abstoßungsreaktionen nach Keratoplastik wurde an vielen verschiedenen Modellen untersucht. Mit mannigfaltigen Strategien wurde der Versuch unternommen, diesen Prozess nachhaltig unter Kontrolle zu bringen.

Antilymphozytenserum, Cyclophosphamid, Cyclosporin A und mAK wurden zunächst überwiegend am Kaninchenaugen geprüft, wobei die Aussagekraft durch die unzureichende immunologische Charakterisierung von Kaninchen stark eingeschränkt ist. Untersuchungen an Ratte und Maus bieten dagegen deutlich günstigere Voraussetzungen. Auch wenn sich die gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen lassen, scheint das Modell der Ratte für immunologische Untersuchungen am Auge doch sehr geeignet zu sein.

Es ist denkbar, dass durch den Einsatz des viralen Gentransfers sowohl die Endothelzellichte vor der Transplantation verbessert als auch durch gentherapeutische Maßnahmen einem Endothelzellverlust nach Transplantation vorgebeugt werden kann.

Eine Alternative dazu wäre der Einsatz von Adenoviren der 2. und 3. Generation, bei denen weitere virale Gene entfernt wurden und die deshalb eine deutlich verlängerte Genexpression und reduzierte Entzündungsreaktion bewirken (Kay et al., 2001a).

Auch das Ausweichen auf weniger immunogene Vektorsysteme, wie Lentiviren, adenoassoziierte Viren, Lipofectin oder Liposomen als Transportvehikel wäre denkbar. Allerdings besteht hier noch das Problem der geringeren Gentransfereffizienz.

Der liposomenvermittelte Gentransfer in Hornhautendothelzellen scheint ein viel versprechender Ansatz zu sein, ohne eine Immunantwort gegen die transduzierten Zellen auszulösen (Pleyer et al., 2002). So hat die lokale Behandlung mit liposomeninkorporierten Wirkstoffen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Jedoch ist die Effizienz des Gentransfers ungleich geringer als bei viralen Vektoren (Bertelmann et al., 2003). Viele Probleme der in-vitro-Stabilität, Sterilität und Herstellungstechnologie reproduzierbarer Liposomenpräparationen sind inzwischen gelöst worden. Die kurze biologische Halbwertszeit von Liposomen durch Elimination im retikuloendothelialen System schränkt die intravenöse Anwendung jedoch deutlich ein. Lösungsmöglichkeiten für dieses Problem liegen in Verfahren, die die Stabilität der Liposomenmembran erhöhen. Im Hinblick auf die Anwendung von Liposomen in der Augenheilkunde erscheint die lokale Applikation jedoch vorteilhafter. Es wäre wünschenswert, die klinische Anwendung in der Augenheilkunde weitergehend zu untersuchen und die potentiellen Vorteile von Liposomen als Vektor

therapeutisch nutzbar machen zu können. Als Vektoren für immunmodulatorische Substanzen wie beispielsweise Interleukine sind sie nach wie vor von großem Interesse.

Die genetische Manipulation von Effektorzellen der Immunantwort bzw. der drainierenden Lymphknoten stellt ebenfalls einen interessanten Ansatz zur Verhinderung der Transplantatabstoßung dar.

Die Kombination der genannten Strategien verspricht die größte Aussicht auf Erfolg. Bei der Keratoplastik betrifft dies vor allem den Schutz des empfindlichen Endothels, dessen Vitalität eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Hornhauttransplantation darstellt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Aboalchamat,B., Engelmann,K., Bohnke,M. Eggli,P., and Bednarz,J. (1999). Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. *Exp. Eye Res.* **69**, 547-553.

Abraham,N.G., da Silva,J.L., Lavrovsky,Y., Stoltz,R.A., Kappas,A., Dunn,M.W., and Schwartzman,M.L. (1995). Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer into rabbit ocular tissues. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 2202-2210.

Allredge,O.C. and Krachmer,J.H. (1981). Clinical types of corneal transplant rejection. Their manifestations, frequency, preoperative correlates, and treatment. *Arch. Ophthalmol.* **99**, 599-604.

Ardjomand,N., McAlister,J.C., Rogers,N.J., Tan,P.H., George,A.J. and Larkin,D.F. (2003). Modulation of costimulation by CD28 and CD154 alters the kinetics and cellular characteristics of corneal allograft rejection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 3899-3905.

Bacchetta,R., Biglet,M., Touriane,J.L., Parkman,R., Tovo,P.A., Abrams,J., de Waal Malefyf,R., de Vries,J.E. and Roncarolo,M.G. (1994). High levels of IL-10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **179**, 493-502.

Bertelmann,E., Ritter,T., Vogt,K., Reszka,R., Hartmann,C. and Pleyer,U. (2003). Efficiency of cytokine gene transfer in corneal endothelial cells and organ-cultured corneas mediated by liposomal vehicles and recombinant adenovirus. *Ophthalmic Res.* **35**, 117-124.

Blazar,B.R., Taylor,P.A., Panoskaltsis-Mortari,A., Narula,S.K., Smith,S.R., Roncarolo,M.G., and Vallera,D.A. (1998). Interleukin-10 dose-dependent regulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell-mediated graft-versus-host disease. *Transplantation* **66**, 1220-1229.

Boehler,A., Chamberlain,D., Xing,Z., Slutsky,A.S., Jordana,M., Gauldie,J., Liu,M. and Keshavjee,S. (1998). Adenovirus-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits post-transplant fibrous airway obliteration in an animal model of bronchiolitis obliterans. *Hum Gene Ther.* **9**(4), 541-51.

Boisgerault,F., Liu,Y., Anosova,N., Ehrlich,E., Dana,M.R., and Benichou,G. (2001). Role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in allorecognition: lessons from corneal transplantation. *J. Immunol.* **167**, 1891-1899.

Borras,T., Tamm,E.R., and Zigler,J.S., Jr. (1996). Ocular adenovirus gene transfer varies in efficiency and inflammatory response. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**, 1282-1293.

Budenz,D.L., Bennett,J., Alonso,L., and Maguire,A. (1995). In vivo gene transfer into murine corneal endothelial and trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 2211-2215.

Callanan,D., Peeler,J., and Niederkorn,J.Y. (1988). Characteristics of rejection of orthotopic corneal allografts in the rat. *Transplantation* **45**, 437-443.

- Claerhout,I., Kestelyn,P., Debacker,V., Beele,H., and Leclercq,G. (2004). Role of natural killer cells in the rejection process of corneal allografts in rats. *Transplantation* 77, 676-682.
- Comer,R.M., King,W.J., Ardjomand,N., Theoharis,S., George,A.J., and Larkin,D.F. (2002). Effect of administration of CTLA4-Ig as protein or cDNA on corneal allograft survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1095-1103.
- Coupland,S.E., Krause,L., Karow,A.C., Bartlett,R.R., Lehmann,M., and Hoffmann,F. (1995). Delay in corneal allograft rejection due to anti-CD4 antibody given alone and in combination with cyclosporin A and leflunomide. *Ger J. Ophthalmol.* 4, 294-301.
- Cua,D.J., Coffman,R.L., and Stohlman,S.A. (1996). Exposure to T helper 2 cytokines in vivo before encounter with antigen selects for T helper subsets via alterations in antigen-presenting cell function. *J. Immunol.* 157, 2830-2836.
- Dallman,M.J. (1993). Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 788-793.
- Dallman,M.J., Larsen,C.P., and Morris,P.J. (1991). Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 174, 493-496.
- Dana,M.R., Yamada,J., and Streilein,J.W. (1997). Topical interleukin 1 receptor antagonist promotes corneal transplant survival. *Transplantation* 63, 1501-1507.
- David,A., Chetritt,J., Coupel-Claude,H., Tesson,L., Cassard,A., Blancho,G., Charreau,B., Sigalla,J., Buzelin,F., Le,M.B., Soullillou,J.P., and Anegon,I. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer in rat liver of interleukin 4 but not interleukin 10 produces severe acute hepatitis. *Cytokine* 9, 818-829.
- David,A., Chetritt,J., Guillot,C., Tesson,L., Heslan,J.M., Cuturi,M.C., Soullillou,J.P., and Anegon,I. (2000). Interleukin-10 produced by recombinant adenovirus prolongs survival of cardiac allografts in rats. *Gene Ther.* 7, 505-510.
- Efrat,S., Fejer,G., Brownlee,M., and Horwitz,M.S. (1995). Prolonged survival of pancreatic islet allografts mediated by adenovirus immunoregulatory transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 6947-6951.
- Engelmann,K., Bednarz,J., and Bohnke,M. (1999). Endothelial cell transplantation and growth behavior of the human corneal endothelium. *Ophthalmologe* 96, 555-562.
- Fiorentino,D.F., Zlotnik,A., Mosmann,T.R., Howard,M., and O'Garra,A. (1991a). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147, 3815-3822.
- Fiorentino,D.F., Zlotnik,A., Vieira,P., Mosmann,T.R., Howard,M., Moore,K.W., and O'Garra,A. (1991b). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146, 3444-3451.
- Gain,P., Thuret,G., Chiquet,C., Dumollard,J.M., Mosnier,J.F., and Campos,L. (2001). In situ immunohistochemical study of Bcl-2 and heat shock proteins in human corneal endothelial cells during corneal storage. *Br. J. Ophthalmol.* 85, 996-1000.

- Gajewski,T.F. and Fitch,F.W. (1988). Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J. Immunol.* *140*, 4245-4252.
- George,A.J., and Larkin,D.F. (2004). Corneal transplantation: the forgotten graft. *Am. J. Transplant.* *4*, 678-685.
- Gill,T.J., III, Kunz,H.W., Misra,D.N., and Hassett,A.L. (1987). The major histocompatibility complex of the rat. *Transplantation* *43*, 773-785.
- Gong,N., Pleyer,U., Yang,J., Vogt,K., Hill,M., Anegon,I., Vol,H.-D., and Ritter,T. (2006). Influence of local and systemic CTLA4Ig gene transfer on corneal allograft survival. *J. Gene Med.* *8*, 459-467.
- Gong,N., Pleyer,U., Volk,H.-D., and Ritter,T. (2007). Effects of lokal and systemic viral interleukin-10 gene transfer on corneal allograft survival. *Gene Therapie.* *14*, 484-490.
- Gore,S.M., Vail,A., Bradley,B.A., Rogers,C.A., Easty,D.L., and Armitage,W.J. (1995). HLA-DR matching in corneal transplantation. Systematic review of published evidence. Corneal Transplant Follow-up Study Collaborators. *Transplantation* *60*, 1033-1039.
- Griffith,T.S., Brunner,T., Fletcher,S.M., Green,D.R., and Ferguson,T.A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* *270*, 1189-1192.
- Gronemeyer,U. (1979). Zur Immunbiologie der Hornhauttransplantation. - Modelluntersuchungen an Inzuchtratten. Habilitationsschrift Med. Fak. Kiel.
- Groux,H., O'Garra,A., Bigler,M., Rouleau,M., Antonenko,S., de Vries,J.E., and Roncarolo,M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* *389*, 737-742.
- Guillot,C., David,A., Coathalem,H., Froud,D., Tesson,L., Moullier,P., Le,M.B., Usal,C., Soullillou,J.P., Cuturi,M.C., and Anegon,I. (1999). Adenovirus-mediated cytokine gene transfer in heart allograft transplantation. *Biochem. Soc. Trans.* *27*, 864-869.
- Guillot,C., Mathieu,P., and Coathalem,H. (2000). Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression. *J. Immunol.* *164*, 5258-5268.
- Haskova,Z., Usiu,N., Pepose,J.S., Ferguson,T.A., and Stuart,P.M. (2000). CD4+ T cells are critical for corneal, but not skin, allograft rejection. *Transplantation* *69*, 483-487.
- He,X.Y., Chen,J., Verma,N., Plain,K., Tran,G., and Hall,B.M. (1998). Treatment with interleukin-4 prolongs allogeneic neonatal heart graft survival by inducing T helper 2 responses. *Transplantation* *65*, 1145-1152.
- He,Y.G., Ross,J., and Niederkorn,J.Y. (1991). Promotion of murine orthotopic corneal allograft survival by systemic administration of anti-CD4 monoclonal antibody. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *32*, 2723-2728.
- Hegde,S. and Niederkorn,J.Y. (2000). The role of cytotoxic T lymphocytes in corneal allograft rejection. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 3341-3347.

- Holland,E.J., Chan,C.C., Wetzig,R.P., Palestine,A.G., and Nussenblatt,R.B. (1991). Clinical and immunohistologic studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model. *Cornea* 10, 374-380.
- Horwitz,M.S. (1990). Adenoviridae and their replication. In Fields,B.N. and Knipe, D.M. (eds): *Virology*. Raven Press, New York. pp 1679-1721.
- Jonas,J.B., Rank,R.M., and Budde,W.M. (2002). Immunologic graft reaction after allogenic penetrating Keratoplasty. *Am. J. Ophth.* 133, 437-443.
- Joo,C.K., Pepose,J.S., and Stuart,P.M. (1995). T-cell mediated responses in a murine model of orthotopic corneal transplantation. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 1530-1540.
- Josien,R., Muschen,M., Gilbert,E., Douillard,P., Heslan,J.M., Soulillou,J.P., and Cuturi,M.C. (1998). Fas ligand, tumor necrosis factor-alpha expression, and apoptosis during allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 66, 887-893.
- Joyce,N.C. (2003). Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 359-389.
- Kato,H., Ritter,T., Ke,B., Murakami,M., Kusano,M., Busuttill,R.W., and Kupiec-Weglinski,J.W. (2000). Adenovirus-mediated gene transfer of IL-4 prolongs rat renal allograft survival and inhibits the p21(ras)-activation pathway. *Transplant. Proc.* 32, 245-246.
- Kay,M.A., Glorioso,J.C., and Naldini,L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 7, 33-40.
- Ke,B., Ritter,T., Kato,H., Zhai,Y., Li,J., Lehmann,M., Busuttill,R.W., Volk,H.D., and Kupiec-Weglinski,J.W. (2000). Regulatory cells potentiate the efficacy of IL-4 gene transfer by up-regulating Th2-dependent expression of protective molecules in the infectious tolerance pathway in transplant recipients. *J. Immunol.* 164, 5739-5745.
- Kennedy,M.K., Picha,K.S., Shanebeck,K.D., Anderson,D.M., and Grabstein,K.H. (1994). Interleukin-12 regulates the proliferation of Th1, but not Th2 or Th0, clones. *Eur. J. Immunol.* 24, 2271-2278.
- King,W.J., Comer,R.M., Hudde,T., Larkin,D.F., and George,A.J. (2000). Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation. *Transplantation* 70, 1225-1233.
- Klebe,S., Sykes,P.J., Coster,D.J., Krishnan,R., and Williams,K.A. (2001). Prolongation of sheep corneal allograft survival by ex vivo transfer of the gene encoding interleukin-10. *Transplantation* 71, 1214-1220.
- Klebe,S., Coster,D.J., Sykes,P.J., Swinburne,S., Hallsworth,P., and Scheerlinck,J.P. et al. (2005). Prolongation of sheep corneal allograft survival by transfer of gene encoding ovine IL-12-p40 but not IL-4 to donor corneal endothelium. *J. Immunol.*, 175, 2219-2226.
- Kolls,J., Peppel,K., Silva,M., and Beutler,B. (1994). Prolonged and effective blockade of tumor necrosis factor activity through adenovirus-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 215-219.

- Konig Merediz,S.A., Zhang,E.P., Wittig,B., and Hoffmann,F. (2000). Ballistic transfer of minimalistic immunologically defined expression constructs for IL4 and CTLA4 into the corneal epithelium in mice after orthotopic corneal allograft transplantation. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 238, 701-107.
- Kriegelstein,G.K., Weinreb,R.N., Pleyer,U., Foster,C.S., and Schlickeiser. (2007) *Essentials in ophthalmology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007, Library of congress control number: 2006929209.
- Larkin,D.F. (1994). Corneal allograft rejection. *Br. J. Ophthalmol.* 78, 649-652.
- Larkin,D.F., Oral,H.B., Ring,C.J., Lemoine,N.R., and George,A.J. (1996). Adenovirus-mediated gene delivery to the corneal endothelium. *Transplantation* 61, 363-370.
- Lee,M.S., Wogensen,L., Shizuru,J., Oldstone,M.B.A., and Sarvetick,N. (1994). Pancreatic islet production of murine interleukin-10 does not inhibit immune-mediated tissue destruction. *J. Clin. Invest.* 93, 1332-1338.
- Lenschow,D.J., Walunas,T.L., and Bluestone,J.A. (1996). CD28/B7 System of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 233-258.
- Ling,S., and Hu,Y. (2005). Ipsilateral lymphadenectomy to inhibit corneal allograft rejection in rats. *Huazhong. Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 25 (1), 88-90.
- Ma,Y., Hurst,H.E., and Fernandez-Botran,R. (1996). Soluble cytokine receptors as carrier proteins: effects of soluble interleukin-4 receptors on the pharmacokinetics of murine interleukin-4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 340-350.
- Medawar,P.B. (1944). The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J. Anat.* 78, 176-199.
- Medawar,P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol.* 29, 58-6.
- Merville,P., Pouteil-Noble,C., Wijdenes,J., Potaux,L., Touriane,J.L., and Banchereau,J. (1993). Detection of single cells secreting IFN- γ , IL-6 and IL-10 in irreversibly rejected human kidney allografts, and their modulation by IL-2 and IL-4. *Transplantation* 55, 639-646.
- Merville,P., Lambert,C., Durand,I., Pouteil-Noble,C., Touriane,J.L., Berthoux,F., and Banchereau,J. (1995). High frequency of IL-10 secreting CD4+ graft-infiltrating T lymphocytes in promptly rejected kidney allografts. *Transplantation* 59, 1113-1119.
- Mottram,P.L., Han,W.R., Purcell,L.J., McKenzie,I.F., and Hancock,W.W. (1995). Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and interferon-gamma in long-surviving mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation* 59, 559-565.
- Nicholls,S.M., Banerjee,S., Figueiredo,F.C., Crome,S., Mistry,S., Easty,D.L., and Dick,A.D. (2006). Differences in leukocyte phenotype and interferon-gamma expression in stroma and endothelium during corneal graft rejection. *Exp. Eye Res.* 83(2), 339-47.

Nickerson,P., Steiger,J., Zheng,X.X., Steele,A.W., Steurer,W., Roy-Chaudhury,P., and Strom,T.B. (1997). Manipulation of cytokine networks in transplantation: false hope or realistic opportunity for tolerance? *Transplantation* 63, 489-494.

Niederhorn,J.Y. (1999). The immune privilege of corneal allografts. *Transplantation* 67, 1503-1508.

Nishi,Y., Hosokawa,T., Aoike,A., Kawai,K., and Kamahara,T. (1990). Early development of CD8-negative and CD8-positive MHC-unrestricted cytotoxic cells induced by alloantigen inoculation in mice. *Microbiol. Immunol.* 34, 775-785.

Olive,M., Eisenlohr,L., Flomenberg,N., Hsu,S., and Flomenberg,P. (2002). The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. *Hum. Gene Ther.* 13, 1167-1178.

Oral,H.B., Larkin,D.F., Fehervari,Z., Byrnes,A.P., Rankin,A.M., Haskard,D.O., Wood,M.J., Dallman,M.J., and George,A.J. (1997). Ex vivo adenovirus-mediated gene transfer and immunomodulatory protein production in human cornea. *Gene Ther.* 4, 639-647.

Palmer,T.D., Rosman,G.J., Osborne,W.R., and Miller,A.D. (1991). Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(4), 1330-1334.

Piccotti,J.R., Chan,S.Y., Van Buskirk,A.M., Eichwald,E.J., and Bishop,D.K. (1997). Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious, or irrelevant in promoting allograft survival? *Transplantation* 63, 619-624.

Pleyer,U., Weidle,E.G., Lisch,W., Steuhl,K.P., Mohrle,C., Richter,U., Zierhut,M., and Selbmann,H.K., (1990). Clinical types of immunologic transplant reactions following perforating keratoplasty. *Fortschr Ophthalmol.* 87(1), 14-9.

Pleyer,U., Steuhl,K.P., Weidle,E.G., Lisch,W., and Thiel,H.J. (1992). Corneal graft rejection: incidence, manifestation, and interaction of clinical subtypes. *Transplant. Proc.* 24, 2034-2037.

Pleyer,U., Milani,J.K., Dukes,A., Chou,J., Lutz,S., Ruckert,D., Thiel,H.J., and Mondino,B.J. (1995). Effect of topically applied anti-CD4 monoclonal antibodies on orthotopic corneal allografts in a rat model. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 52-61.

Pleyer,U., Rieck,P., Ritter,T., and Hartmann,C. (1998). Immune reaction after penetrating keratoplasty. II. Prevention and therapy. *Ophthalmologie* 95, 444-459.

Pleyer,U., Bertelmann,E., Rieck,P., Hartmann,C., Volk,H.D., and Ritter,T. (2000). Survival of corneal allografts following adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 238, 531-536.

Pleyer,U., and Dannowski,H. (2002). Delivery of genes via liposomes to corneal endothelial cells. *Drug News Prospect.* 15, 283-289.

Powrie,F., Menon,S., and Coffman,R.L. (1993). Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur. J. Immunol.* 23, 3043-3049.

- Qian,Y. and Dana,M.R. (2001). Molecular mechanisms of immunity in corneal allotransplantation and xenotransplantation. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2001, 1-21.
- Qin,L., Chavin,K.D., Ding,Y., Favaro,J.P., Woodward,J.E., Lin,J., Tahara,H., Robbins,P., Shaked,A., and Ho,D.Y.. (1995). Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. Immunosuppression with TGF-beta 1 or vIL-10. *Transplantation* 59, 809-816.
- Qin,L., Ding,Y., Pahud,D.R., Chang,E., Imperiale,M.J., and Bromberg,J.S. (1997a). Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum. Gene Ther.* 8, 2019-2029.
- Qin,L., Ding,Y., Pahud,D.R., Robson,N.D., Shaked,A., and Bromberg,J.S. (1997b). Adenovirus-mediated gene transfer of viral interleukin-10 inhibits the immune response to both alloantigen and adenoviral antigen. *Hum. Gene Ther.* 8, 1365-1374.
- Raisanen-Sokolowski,A., Glysing-Jensen,T., and Russell,M.E. (1998). Leukocyte-suppressing influences of interleukin (IL)-10 in cardiac allografts: insights from IL-10 knockout mice. *Am. J. Pathol.* 153(5), 1491-500.
- Reinhard,T., Hutmacher,M., and Sundmacher,R. (1997). Acute and chronic immune reactions after penetrating keratoplasty with normal immune risk. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 210, 139-143.
- Reinhard,T., Kontopoulos,T., Wernet,P., Enczmann,J., and Sundmacher,R., (2004). Long-term results of homologous penetrating limbokeratoplasty in total limbal stem cell insufficiency after chemical/thermal burns. *Ophthalmol.* 101(7):682-7.
- Rieck,P.W., Gigon,M., Jaroszewski,J., Pleyer,U., and Hartmann,C. (2003). Increased endothelial survival of organ-cultured corneas stored in FGF-2-supplemented serum-free medium. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3826-3832.
- Rinne,J.R. and Stulting,R.D. (1992). Current practices in the prevention and treatment of corneal graft rejection. *Cornea* 11, 326-328.
- Ritter,T., Risch,K., Schroder,G., Kolls,J., Siegling,A., Graser,E., Reinke,P., Brock,J., Lehmann,M., and Volk,H.D. (1999a). Intragraft overexpression of interleukin-4 is neither sufficient nor essential for tolerance induction to cardiac allografts in a high-responder strain combination. *Transplantation* 68, 1427-1431.
- Ritter,T., Vogt,K., Rieck,P., Schilling-Schon,A., Kolls,J., Hartmann,C., Volk,H.D., and Pleyer,U. (1999b). Adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4 to corneal endothelial cells and organ cultured corneas leads to high IL-4 expression. *Exp. Eye Res.* 69, 563-568.
- Ritter,T., Brandt,C., Prosch,S., Vergopoulos,A., Vogt,K., Kolls,J., and Volk,H.D. (2000). Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-IE promoter activity in human endothelial cells. *Cytokine* 12, 1163-1170.
- Ritter,T., Lehmann,M., and Volk,H.D. (2002). Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors. *BioDrugs.* 16, 3-10.

Ritter,T., Gong,N., and Pleyer,U. (2005). Is ex vivo adenovirus mediated gene transfer a therapeutic option for the treatment of corneal diseases? *Br. J. Ophthalmol.* *89*, 648-648

Sanfilippo,F., MacQueen,J.M., Vaughn,W.,K., and Foulks,G.N. (1986). Reduced graft rejection with good HLA-A and B matching in high-risk corneal transplantation. *N. Engl. J. Med.* *315(1)*, 29-35.

Sano,Y., Osawa,H., Sotozono,C., and Kinoshita,S. (1998). Cytokine expression during orthotopic corneal allograft rejection in mice. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *39*, 1953-1957.

Sayegh,M.H., Akalin,E., Hancock,W.W., Russell,M.E., Carpenter,C.B., Linsley,P.S., and Turka,L.A. (1995). CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J. Exp. Med.* *181*, 1869-1874.

Schaub,M., Stadlbauer,T.H., Chandraker,A., Vella,J.P., Turka,L.A., and Sayegh,M.H. (1998). Comparative strategies to induce long-term graft acceptance in fully allogeneic renal versus cardiac allograft models by CD28-B7 T cell costimulatory blockade: role of thymus and splen. *J. Am. Soc. Nephrol.* *9*, 891-898.

Slegers,T.P., Torres,P.F., Broersma,L., Van,R.N., Van,R.G., and van der Gaag,R. (2000). Effect of macrophage depletion on immune effector mechanisms during corneal allograft rejection in rats. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 2239-2247.

Slegers,T.P., van der Gaag,R., Van,R.N., Van,R.G., and Streilein,J.W. (2003). Effect of local macrophage depletion on cellular immunity and tolerance evoked by corneal allografts. *Curr. Eye Res.* *26*, 73-79.

Smith,D.K., Korbitt,G.S., Suarez-Pinzon,W.L., Kao,D., Rajotte,R.V., and Elliott,J.F. (1997). Interleukin-4 or interleukin-10 expressed from adenovirus-transduced syngeneic islet grafts fails to prevent beta cell destruction in diabetic NOD mice. *Transplantation* *64(7)*, 1040-9.

Stein,J., Volk,H.D., Liebenthal,C., Kruger,D.H., and Prosch,S. (1993). Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J. Gen. Virol.* *74 (Pt 11)*, 2333-2338.

Stuart,P.M., Griffith,T.S., Usui,N., Pepose,J., Yu,X., and Ferguson,T.A. (1997). CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J. Clin. Invest* *99*, 396-402.

Sundmacher,R. (1977). Allograft rejection reactions after keratoplasty. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* *71(5)*, 705-22.

Sundmacher,R., and Muller,O. (1983). Endothelial cell loss after keratoplasty. Specular microscopic observations of immune reactions against donor endothelium. *Klin Monatsbl. Augenheilkd.* *182(1)*, 86-9.

Sung,R.S., Qin,L., and Bromberg,J.S. (2001). TNFalpha and IFNgamma induced by innate anti-adenoviral immune responses inhibit adenovirus-mediated transgene expression. *Mol. Ther.* *3*, 757-767.

Takeuchi,T., Lowry,R.P., and Konieczny,B. (1992). Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation* 53, 1281-1294.

Takeuchi,T., Ueki,T., Sunaga,S., Ikuta,K., Sasaki,Y., Li,B., Moriyama,N., Miyazaki,J., and Kawabe,K. (1997). Murine interleukin 4 transgenic heart allograft survival prolonged with down-regulation of the Th1 cytokine mRNA in grafts. *Transplantation* 64, 152-157.

Thiel,H.J. and Manthey,K.F., (1980). Incidence of immune reactions following penetrating keratoplasty. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 77(3), 274-83.

Thiel,M.A., Steiger,J.U., O'Connell,P.J., Lehnert,A.M., Coster,D.J., and Williams,K.A. (2005). Local or short-time systemic costimulatory molecule blockade prolongs rat corneal allograft survival. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 33, 176-180.

Thylefors,B., Negrel,A.D., Pararajasegaram,R., and Dadzie,K.Y. (1995). Global data on blindness. *Bull. World Health Organ* 73, 115-121.

Torres,P.F., de Vos,A.F., van der Gaag,R., Martins,B., and Kijlstra,A. (1996). Cytokine mRNA expression during experimental corneal allograft rejection. *Exp. Eye Res.* 63, 453-461.

Torres,P.F., de Vos,A.F., Martins,B. and Kijlstra,A. (1999) Interleukin 10 treatment does not prolong experimental corneal allograft survival. *Ophthalmic. Res.* 31(4), 297-303.

Vail,A., Gore,S.M., Bradley,B.A., Easty,D.L., Rogers,C.A., and Armitage,W.J. (1994). Influence of donor and histocompatibility factors on corneal graft outcome. *Transplantation* 58, 1210-1216.

Verma,I.M. and Somia,N. (1997). Gene therapy — promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-242.

Verwaerde,C., Naud,M.C., and Delanoye,A. (2003). Ocular transfer of retinal glial cells transduced ex vivo with adenovirus expressing viral IL-10 or CTLA4-Ig inhibits experimental autoimmune uveoretinitis. *Gene Ther.* 10, 1970-1981.

de Vries,J.E. (1995). Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann. Med.* 27, 537-541.

de Waal,M.R., Haanen,J., Spits,H., Roncarolo,M.G., Te,V.A., Figdor,C., Johnson,K., Kastelein,R., Yssel,H., and de Vries,J.E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 174, 915-924.

de Waal,M.R. and Moore,K.W. (1998). Interleukin-10. In Angus, T. (ed.): *The cytokine handbook*. Academic press., London, pp 333-364.

Wackenheim-Urlacher,A., Kantelip,B., Falkenrodt,A., Piquot,X., Tongio,M.M., Montard,M., and Delbosc,B. (1995). T-cell repertoire of normal, rejected, and pathological corneas: phenotype and function. *Cornea* *14*, 450-456.

Williams,K.A. and Coster,D.J. (1997). Rethinking immunological privilege: implications for corneal and limbal stem cell transplantation. *Mol. Med. Today* *3*, 495-501.

Williams,K.A., Muehlberg,S.M., and Lewis,R.F. (1997). The Australian corneal graft registry 1996 report. Adelaide Mercury Press. *11*, 47.

Wold,W.S. and Gooding,L.R. (1991). Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* *184*, 1-8.

Yamada,J., Ksander,B.R., and Streilein,J.W. (2001). Cytotoxic T cells play no essential role in acute rejection of orthotopic corneal allografts in mice. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 386-392.

Yamada,J., Yoshida,M., Taylor,A.W., and Streilein,J.W. (1999). Mice with Th2-biased immune systems accept orthotopic corneal allografts placed in "high risk" eyes. *J. Immunol.* *162*, 5247-5255.

Yamagami,S., Kawashima,H., Endo,H., Tsuru,T., Shibui,H., Kagawa,Y., Hori,J., Yamagami,H., and Isobe,M. (1998). Cytokine profiles of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation. *Transplantation* *66*, 1504-1510.

Yamagami,S., Kawashima,H., Tsuru,T., Yamagami,H., Kayagaki,N., Yagita,H., Okumura,K., and Gregerson,D.S. (1997). Role of Fas-Fas ligand interactions in the immunorejection of allogeneic mouse corneal transplants. *Transplantation* *64*, 1107-1111.

Yang,J., Reutzel-Selke,A., Steier,C., Jurisch,A., Tullius,S.G., Sawitzki,B., Kolls,J., Volk,H.D., and Ritter,T. (2003). Targeting of macrophage activity by adenovirus-mediated intragraft overexpression of TNFRp55-Ig, IL-12p40, and vIL-10 ameliorates adenovirus-mediated chronic graft injury, whereas stimulation of macrophages by overexpression of IFN-gamma accelerates chronic graft injury in a rat renal allograft model. *J. Am. Soc. Nephrol.* *14*, 214-225.

Yang,Y.L.Q., Ertl,H.C., and Wilson,J.M. (1995). Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J. Virol.* *69*, 2004-2015.

Zuo,Z., Wang,C., Carpenter,D., Okada,Y., Nicolaidou,E., Toyoda,M., Trento,A., and Jordan,S.C. (2001). Prolongation of allograft survival with viral IL-10 transfection in a highly histoincompatible model of rat heart allograft rejection. *Transplantation* *71*, 686-691.

7 ANHANG

7.1 Kongressbeiträge/Poster/Veröffentlichungen

ARVO 2002 Annual Meeting in Fort Lauderdale, Florida, USA (5.5.-10.5.2002)

Sedlakova K., Dannowski H., Brandt C., Schmidt N., Filipec M., Hartmann C., Ritter T., Pleyer U. (2002). *Adenovirus-Mediated Gene Transfer of vIL-10 in Experimental Corneal Transplantation*. Invest Ophthalmol Vis Sci 43: E-Abstract 2279.

EVER 2002 Joint European Research Meeting in Ophthalmology and Vision, Alicante, Spanien (2.10.-5.10.2002)

Schmidt N., Dannowski H., Sedlakova K., Ritter T., Pleyer U. (2002). *Immunohistological investigation of infiltrating cells after viral interleukin-10 transduction in experimental keratoplasty*. Ophthalmic Res 34:Suppl.1:39.

ARVO 2003 Annual Meeting in Fort Lauderdale, Florida, USA (4.5.-9.5.2003)

Schmidt N., Dannowski H., Sedlakova K., Ritter T., Pleyer U. (2003). *Immunohistological investigation of infiltrating cells after viral interleukin-10 transduction in experimental keratoplasty*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 44: E-Abstract 4659.

Klinische Studie (2008)

Pleyer U., Ruokonen P., Schmidt N., Feist E., Höhne M., Stanojlovic S. *Ein Beitrag zur Anwendung von Mycophenolsäure bei Autoimmunerkrankungen des Auges: Können wir die Therapie optimieren?* Klin. Monatsbl. Augenheilkd., 18.01.2008; 225: 1-4. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.

7.2 *Lebenslauf*

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

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Uwe Pleyer, der mir das Thema bereitstellte und mich während meiner Promotionszeit hervorragend betreute. Außerdem habe ich mich sehr über die Möglichkeit gefreut, „die ARVO“ zu besuchen. Vielen Dank auch dafür.

Bei Prof. Dr. Thomas Ritter möchte ich mich herzlich für die Zusammenarbeit in der Immunologie sowie seine Geduld und Hilfe auch in schwierigen Situationen bedanken. Darüber hinaus wurden die adenoviralen Vektoren in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Ritter, Institut für Medizinische Immunologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, hergestellt.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Augenklinik und des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité sowie anderer Einrichtungen bedanken, die mir durch Beantwortung von Fragen, Beschaffung von Materialien und auch durch aufmunternden Humor behilflich waren.

Sylvia Metzner war meine Ansprechpartnerin in der Ziegelstraße, half mir bei der Materialbeschaffung und trug durch ihre Kompetenz in Fragen der Anfertigung von immunhistologischen Färbungen sowie deren Fotografien ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ich danke Dr. Haike Dannowski für die Zusammenarbeit, die freundschaftliche Solidarität sowie für ihre Hilfe beim Zellenzählen und bei vielen anderen wichtigen Fragen. Sie führte die Kultivierung der Korneae und den adenoviralen Gentransfer im Rahmen ihrer Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat. im Fach Biologie durch.

Dr. Klara Sedlakova führte die Transplantationen der adenoviral transduzierten Hornhäute durch. Auch ihr gilt mein Dank.

Meiner Familie danke ich für Unterstützung und Motivation.

Herrn Schlickeiser möchte ich für die freundliche Bereitstellung der graphischen Abbildungen danken, die ich verwenden und modifizieren durfte.

Meinen Freunden Katja Müller, Marie Krüger und Hans Prengel danke ich ebenfalls für Ihre Unterstützung.

Und schließlich möchte ich Franz-Josef dafür danken, dass er mich motiviert hat, mir auch in schwierigen Augenblicken Verständnis entgegenbrachte, mich unterstützte, wo er konnte, und dessen Vorbild mir ein Ansporn war.

7.3 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Nadine Dieste, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Gentransfer von Interleukin-10-Protein in die Kornea: Untersuchungen zur Prävention der Transplantatabstoßung nach perforierender Keratoplastik“ 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.“

Berlin, den 18.09.2009

Nadine Dieste