

3. Überwindung der initialen Immunbarriere in der Xenotransplantation (P3-P8)

Die Xenotransplantation von Tierorganen auf den Menschen ist ein seit langem gehegter Traum, der eine Lösung des bestehenden Organmangels bedeuten würde. Lange vor den ersten erfolgreichen Allotransplantationen wurden Berichte über die Transplantation von tierischem Gewebe auf menschliche Empfänger veröffentlicht [36,37]. In Abhängigkeit vom verwendeten Organ ist jedoch mit unterschiedlich hohen Hindernissen zur Überwindung der hyperakuten Abstoßung bzw. physiologischer Inkompatibilitäten zu rechnen. In Anlehnung an den Sergio Leone Filmtitel „The good, the bad and the ugly“ (1966) charakterisierte C. Hammer die zu erwartenden Probleme in der klinischen Xenotransplantation in der Abstufung Niere-Herz-Leber, wobei der Xenotransplantation der Leber die Rolle des „the ugly“ zukommt. Mehr als bei Niere und Herz sind für die Leber-Xenotransplantation neben der immunologischen Barriere zwischen Spezies auch physiologische Inkompatibilitäten zu berücksichtigen, welche diese pessimistische prognostische Einschätzung begründen.

Bei der Xenotransplantation erfolgt die Transplantation über Speziesbarrieren hinweg. In Abhängigkeit von der phylogenetischen Verwandtschaft wird dabei die Konstellation Spender-Empfänger als konkordant oder diskordant bezeichnet. Transplantationen zwischen nah verwandten Spezies, z.B. Mensch und Schimpanse, gelten als konkordant, zwischen entfernt verwandten Spezies, z.B. Mensch und Schwein, als diskordant. In der diskordanten Kombination kommt es nach Transplantation charakteristischerweise zur hyperakuten Abstoßung des Spenderorganes im Empfänger. Die konkordante Spezieskombination zeichnet sich durch die Abwesenheit einer hyperakuten xenogenen Abstoßungsreaktion (HXR) aus [38,39].

Die HXR ist durch die Destruktion von Gefäßen des Xenotransplantates unmittelbar nach Reperfusion gekennzeichnet, die zu einer ausgedehnten interstitiellen Hämorrhagie und ubiquitärer Thrombosierung und letztendlich zur Parenchymdestruktion führt [38]. Die HXR wird durch präformierte xenoreaktive Antikörper gegen Spenderantigene eines xenogenen Spenders induziert [38,40,41]. Als wesentliches Ziel der präformierten humanen Xenoantikörper wurde der Galactose- $\alpha(1,3)$ -Galactose (Gal)-Kohlenhydratrest auf der Zelloberfläche von Neuweltaffen und niedrigeren Säugetierspezies identifiziert [38]. Das Vorkommen von natürlichen Antikörpern gegen Gal in Menschen- und Altweltaffen und Menschen korreliert mit evolutionären Unterschieden zwischen Spezies hinsichtlich der Abwehr bakterieller Antigene [42]. Nach Anbindung von präformierten xenoreaktiven Antikörpern an überwiegend Gal- Xenoantigene kommt es zu einer potenten Aktivierung des Komplementsystems und zu einer Endothelzellaktivierung mit nachfolgender Entwicklung

eines prokoagulativen und proinflammatorischen Zustandes [38,40,42,43]. Die Komplementaktivierung repräsentiert einen zentralen Schritt in der HXR und beruht überwiegend auf der Aktivierung des klassischen Komplementaktivierungspfad, in geringerem Ausmaß auch, direkt, ohne Antikörperbindung, des alternativen Pfades. Wie von unserer Arbeitsgruppe [P3-5] aber auch anderen Arbeitsgruppen gezeigt kann sowohl durch eine Depletion xenoreaktiver Antikörper als auch durch Komplementinaktivierung oder -depletion, z.B. durch Cobra Venom Faktor oder löslichen Komplementrezeptor 1, eine Verhinderung der HXR erreicht werden [44].

Die Persistenz bzw. das Wiederauftreten von anti-Gal Antikörpern oder/und die Neuf ormation von nicht-anti-Gal Antikörpern kann im weiteren zu einem Vorgang führen, der in der Literatur variierend als akute vaskuläre Rejektion, verzögerte Xenotransplantabstoßung oder akute humorale Abstoßung bezeichnet wird [40,45]. Die akute zelluläre Abstoßung, die sich mutmaßlich von der akuten zellulären Abstoßung in der Allotransplantation unterscheidet und letztlich nicht im Detail charakterisiert ist [46-51], tritt als isoliertes Phänomen in der Xenotransplantation selten auf und ist meist assoziiert mit der verzögerten Xenotransplantatabstoßung, bzw. Vorbote einer chronischen Xenotransplantatabstoßung.

Obgleich Menschen- und Altweltaffen aufgrund ihrer immunologischen Konkordanz zum Menschen ideale Spender wären, kommen sie in der Realität auf Grund von ethischen Überlegungen, ökonomischen Aspekten, der schwierigen Aufzucht, der langen Generationszeit, aber auch der potentiellen Übertragung humanpathogener Erreger nicht als Spender in Betracht. Hingegen wird das Schwein als Spender der Wahl angesehen [52], obgleich es eine zum Menschen diskordante Spezies [52] darstellt und nur partiell anatomisch, physiologisch und biochemisch kompatibel ist [53]. Selbst bei biochemischer Ähnlichkeit besteht die Möglichkeit einer geringeren Effektivität von Xenoproteinen, Xenoenzymen, etc. [54]. Einer der großen Vorteile der Spenderspezies Schwein spiegelt sich auf dem Feld wider, auf dem die wesentlichen Fortschritte in der Xenotransplantation im letzten Jahrzehnt erreicht wurden – in der genetischen Manipulation zur Expression extrinsischer, humaner Gene, die manche Barrieren zur klinischen Xenotransplantation überwinden helfen könnten [55].

Dabei stand in den 90-er Jahren des 20. Jahrhunderts die transgene Expression von humanen Komplementregulationsproteinen, v.a. von humanem Decay Accelerating Factor (hDAF), im Vordergrund [56]. Es konnte gezeigt werden, daß in für humanen Decay Accelerating Factor (hDAF-CD55) und humanes Membran Cofactor Protein (hMCP-CD46) transgenen Mäusen eine Regulation der Komplementaktivierung während Xenoperfusion stattfindet [57,58]. Eine Resistenz gegenüber Lyse durch Primaten- und Menschenserum

wurde für die Expression von humanem CD59 (hCD59) in transgenen Schweinen [59], von hCD59 und/oder hDAF auf Ratten-Endothelzellen [60] und hDAF in transgenen Schweinen [61] bewiesen. Die Effektivität dieser Modifikation wurde außer in den hier nachfolgend beschriebenen Versuchen [P3-5] in Herz- und Nieren-Xenoperfusionsversuchen untersucht [62,63].

In den von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten ex vivo Leberperfusionsversuchen kam außer den genannten hDAF transgenen Spendertieren eine Immunoapherese-Technologie zum Einsatz, die durch die Spezifität der polyklonalen Schaf-anti-Mensch Antikörper für γ -Schwerketten und κ/λ -Leichtketten eine Adsorption aller für die HXR relevanten Antikörper (IgM, IgG, IgA) zuließ. Beide Modifikationen führten zu einer deutlichen Reduktion der biochemisch und histologisch nachweisbaren Organschädigung in extrakorporalen Leberperfusionsversuchen mit Verbesserung der Organfunktion, -perfusion und der rheologischen Daten. Beide Verfahren resultierten in einer deutlichen Verminderung der Organschädigung und der Komplementaktivierung [P3-5].

Obwohl die Messung der C3a Spiegel auch eine erhebliche Komplementinhibition nach Ak-Reduktion nahelegte, fielen die Werte durch hDAF-Expression noch deutlicher, was eine Wirkung des membranständigen hDAF anzeigte. Die Daten der C4d und Bb Fragment Messungen zeigten ähnliche Ergebnisse wie die C3a Messungen, wobei C4d tendentiell niedriger in der Apherese-Gruppe, jedoch Bb-Fragment niedriger in der Gruppe der hDAF-Lebern war. Dies bedeutet, daß durch beide Interventionen eine Verringerung der klassischen und alternativen Komplementaktivierung, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, stattfand. Die geringere Aktivierung des alternativen Pfades ist in beiden Gruppen durch eine reduzierte Bildung der klassischen C3/C5 Konvertase C4b2a erklärbar, die einer der wichtigsten Faktoren zur alternativen Komplementaktivierung darstellt [64,65]. Dies war einerseits auf die durch Apherese induzierte IgG/IgM Depletion, bzw. andererseits auf die hDAF-Wirkung auf dem porcinen Gefäßendothel zurückzuführen. Nach Apherese war zudem die IgA-Depletion als mitverantwortlich anzusehen [66], im transgenen Modell die Unterbrechung des Rückkopplungsmechanismus innerhalb der Aktivierung des alternativen Pfades durch hDAF [64].

Wie die immunhistologischen Ergebnisse zeigten, war die Komplementinhibition durch hDAF-Expression bei unveränderter Antikörperablagerung effektiver als nach Antikörperdepletion. Auffällig war dabei vor allem das fast vollständige Fehlen von Komponenten jenseits der C3-Aktivierungsstufe. Bemerkenswerterweise war jedoch auch die Ablagerung von Komponenten des klassischen Pfades in hDAF-Lebern, trotz unverändert hoher IgM/IgG-Deposition, stark reduziert. Die weitreichende Komplementinhibition in Lebern transgener Schweine spiegelte sich auch in den Histologien

wider, die keine nachweisbaren hepatozellulären Schädigungen aufwiesen. Beide Verfahren beeinflussten jedoch nicht die Leukozytensequestration und Thrombozytenakkumulation [P3-5,67].

Trotz dieser ermutigenden Daten überlebten hDAF-transgene Schweineorgane in nicht-humanen Primaten nicht länger als 3 Monate [68]. Kürzlich veröffentlichte Daten zeigten, daß hDAF exprimierende Schweineorgane trotz hochdosierter Immunsuppression der als Empfänger verwendeten Primaten weiterhin durch humorale Mechanismen abgestoßen wurden [38,69,70]. Gleichsam pessimistisch bzgl. der Xenotransplantation der Leber stimmt die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte mehrjährige Erhebung weltweit verfügbarer klinischen Daten über den Einsatz der extrakorporalen Leberperfusion (ECLP) im akuten Leberversagen [P6]. Die univariate und multivariate statistische Auswertung der vollständig erfassbaren klinischen Daten zeigte keinen Überlebensvorteil der ECLP mit Schweinelebern gegenüber der konventionellen Intensivtherapie. Pavianlebern und humane Lebern resultierten demgegenüber in signifikant besserem Überleben [P6, 71]. Die baldige klinische Xenotransplantation von Lebern in diskordanter Konstellation (Schwein auf Mensch) muss daher aufgrund der grossen physiologischen Inkompatibilitäten weitaus skeptischer eingeschätzt werden als eine Xenotransplantation von Herz und Nieren [72].

Andere Anwendungsbereiche für porcine Leberzellen könnten sich im Bereich der Leberersatzverfahren und der Hepatozytentransplantation ergeben. In mehreren Studien wurde die Sicherheit, in bestimmten Patientensubpopulationen auch die Wirksamkeit von bioartifiziellen Leberersatzverfahren auf dem Boden porciner Zellen zur Behandlung des fulminanten und subakuten Leberversagens nachgewiesen [P7,73,74]. Zum jetzigen Zeitpunkt stehen jedoch hinreichende Daten zur letztendlichen Bewertung zellbasierter Leberunterstützungssysteme weitgehend aus, v.a. in Abgrenzung gegenüber Detoxifikationssystemen, wie z.B. der Single Pass Albumindialyse oder dem Molecular Adsorbent Recirculation System (MARS) [P8]. Hinsichtlich der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der Transplantation porciner Hepatozyten im akuten Leberversagen oder zur gezielten Therapie von Stoffwechselstörungen liegen nur Einzelfallberichte vor, die keine allgemeingültige Aussage zulassen.