

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg  
Chirurgische Klinik I

Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede

**Toleranz und Abstoßung nach  
experimenteller Lebertransplantation:  
Charakterisierung intrahepatischer  
CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten  
nach Phänotyp und Zytokinmuster**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
**Jens Kauczok**  
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2005

**Referent:** Prof. Dr. med. H-J. Gassel

**Korreferent:** Frau Prof. Dr. med. E.-B. Bröcker

**Dekan:** Prof. Dr. med. G. Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung:** 28.12.2005

Der Promovend ist Arzt

Für meine geliebten Eltern.

---

# Inhaltsverzeichnis

---

1. Einleitung .....	1
2. Fragestellung .....	8
3. Material und Methoden .....	9
3.1. Versuchstiere.....	9
3.2. Die orthotope arterialisierte Lebertransplantation.....	10
3.3. Die heterotope Herztransplantation.....	12
3.4. Die Hauttransplantation.....	13
3.5. Durchführung der Organentnahme.....	14
3.6. Histologische Untersuchungen .....	14
3.7. Isolierung von Leberleukozyten .....	15
3.8. Isolierung von Milzleukozyten .....	16
3.9. Durchflußzytometrische Phänotypisierung von Leber- und Milzleukozyten .....	17
3.10. Aufreinigung der CD4 <sup>+</sup> T- Lymphozyten aus Leber und Milz.....	21
3.11. Immunbiologische Analyse der CD4 <sup>+</sup> T- Lymphozyten aus Leber und Milz.....	23
3.11.1. Stimulierung in vitro.....	23
3.11.2. Zytokin-Nachweis im ELISA .....	24
3.11.3. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	25
3.12. Statistische Aufarbeitung der Ergebnisse .....	26
4. Ergebnisse .....	27
4.1. Die Transplantationsgruppen: Immunologische Charakteristika....	27
4.1.1. Die Syngene Kontrollgruppe (SYN).....	28
4.1.2. Die Abstoßungsgruppe (REJ) .....	30
4.1.3. Die Spontantoleranzgruppe (TOL) .....	30
4.2. Die Transplantationsgruppen: Klinischer Verlauf .....	32

---

---

4.3. Analyse der zellulären Vorgänge bei Abstoßung und Spontan- toleranz.....	33
4.3.1. Die Immunantwort in der Peripherie .....	34
4.3.2. Die Immunantwort im Lebertransplantat: Histologische Auswertung .....	36
4.3.3. Die Immunantwort im Lebertransplantat: Quantifizierung und Phänotypisierung .....	38
4.4. Analyse intrahepatischer T-Lymphozyten: Aktivierung .....	44
4.4.1. Aktivierte CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	44
4.4.2. CD45RC <sup>pos</sup> und CD45RC <sup>neg</sup> T-Lymphozyten .....	46
4.5. Analyse intrahepatischer T-Lymphozyten: CD4 <sup>+</sup> Zellen .....	48
4.5.1. Zytokinmuster intrahepatischer CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten: ELISA... 48	
4.5.2. Zytokinmuster intrahepatischer CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten: RT-PCR 50	
<b>5. Beantwortung der Fragen .....</b>	<b>55</b>
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>57</b>
6.1. Die Lebertransplantat-Spontantoleranz.....	57
6.1.1. Funktion von T-Lymphozyten mit unterschiedlichen CD45RC- Isoformen .....	58
6.1.2. Zytokinmuster und T-Zellfunktion.....	60
6.2. Weitere Phänomene zur Lebertransplantat-Toleranz .....	62
6.2.1. Lösliche Formen von MHC-Klasse-I Molekülen.....	63
6.2.2. Antigenmasse und Mikrochimärismus .....	63
6.2.3. T-Zell-Apoptose durch Vernachlässigung oder Aktivierung .....	65
6.3. Das Lebertransplantat: ein immunologisches Multitalent? .....	66
<b>7. Ausblick .....</b>	<b>68</b>
<b>8. Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
Verzeichnis der wichtigsten Abkürzungen .....	82

---

---

# 1. Einleitung

---

Die erste erfolgreiche Lebertransplantation beim Menschen wurde 1963 von Thomas E. Starzl durchgeführt (Starzl TE et al., 1965). Die Standardisierung von Operationstechniken, verbesserte Maßnahmen zur postoperativen Versorgung und vor allem die Weiterentwicklung von Immunsuppressiva (Übersicht bei Schlitt HJ et al., 1998) ließen die Lebertransplantation zu einer etablierten Therapieform für eine Vielzahl fortgeschrittener terminaler Lebererkrankungen werden (Aldersley MA, O'Grady JG, 1995). In Europa werden zur Zeit 1-Jahres-Überlebensraten von durchschnittlich 80% und 5-Jahres-Überlebensraten von 70% erreicht (nach Daten der European FK506 multicentre liver study group, 1995).

Die aktuell in der Klinik eingesetzten Immunsuppressiva, z.B. die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus sowie Glukokortikoide, sind jedoch auch für eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen verantwortlich. Neben einer deutlich höheren Infektionsanfälligkeit gegenüber Viren, Bakterien und Pilzen (Losada I et al., 2002; Neumann H-G, 1996), stellt die höhere Inzidenz von de-novo-Malignomen oder lymphoproliferativen Erkrankungen schwerwiegende Komplikationen für die transplantierten Patienten dar (Penn I, 1996; Jain A et al., 2002). Diese Problematik resultiert aus der weitgehend unspezifischen Suppression des gesamten Immunsystems.

Aus diesem Grund sind Therapiekonzepte zum Schutz des Transplantates notwendig, die nicht das gesamte Abwehrpotential des Immunsystems schwächen. Ein attraktiver Ansatz hierzu könnten so genannte Suppressor- oder Regulator T-Lymphozyten sein. Diese Zellen, die gegenwärtig sehr intensiv untersucht werden, verfügen über die besondere Eigenschaft, die Aktivierung von T-Lymphozyten selektiv zu hemmen (u.a. Wood KJ, Sakaguchi S, 2003).

---

Sollte es möglich werden, diese Zellen in großer Anzahl herzustellen, so wäre es denkbar, mit ihrer Hilfe die gegen das Transplantat gerichtete Immunantwort gezielt ohne den Einsatz von Immunsuppressiva zu hemmen. Dies würde ebenfalls die Fähigkeit des Immunsystems erhalten, Infektionen erfolgreich abzuwehren.

Das Lebertransplantat nimmt unter den vaskularisierten Organtransplantaten eine immunologische Sonderstellung ein (Calne RY et al., 1969). So wurde für das Nagermodeill „Ratte“ gezeigt, dass in bestimmten Stammkombinationen Lebertransplantat-Spontantoleranz auftritt (Zimmermann FA et al., 1979; Zimmermann FA et al., 1984). So akzeptieren Ratten der Inzuchtlinie Dark-Agouti die MHC-differenten Lebertransplantate der Inzuchtlinie Lewis langfristig ohne Immunsuppression; dies wird als Spontantoleranz bezeichnet (Farges O et al., 1994). Hingegen werden Lebertransplantate aus Dark-Agouti Spendern von ihren Lewis-Empfängern innerhalb von 10-12 Tagen ohne Immunsuppression zerstört (Engemann R et al., 1987; Gassel HJ et al., 2000). Diese von der Stammkombination abhängige Transplantat-Spontantoleranz wird für andere allogene Organtransplantate nicht beobachtet; sie werden ohne Immunsuppression immer abgestoßen (Calne RY, 2000; Bishop GA et al., 2002).

Neben dem Phänomen der Spontantoleranz weist die Leber weitere interessante immunologische Eigenschaften auf. So übt sie auf mittransplantierte Organe, die den gleichen MHC-Haplotyp aufweisen wie sie selbst, eine Art „Schutzfunktion“ aus. Dies zeigt sich zum Beispiel nach einer kombinierten Transplantation von Leber und Niere oder von Leber und Pankreas. Hierbei wird in der Regel für das Nieren- oder Pankreastransplantat eine geringere immunsuppressive Dosierung benötigt als bei der Einzeltransplantation des jeweiligen Organs (Calne R et al., 1972; Rasmussen A et al., 1995).

---

Dieser „Schutzeffekt“ des Lebertransplantates auf mittransplantierte Organe ist auch für den sehr immunogenen Dünndarm beschrieben (u.a. Meyer D et al., 2002). Sogar bereits ablaufende Abstoßungsreaktionen können durch das Lebertransplantat rückgängig gemacht werden (Kamada N, Wight DGD, 1984; Wang C et al., 1998).

Auch das klinische Phänomen der „operational tolerance“ scheint mit den immunmodulativen Fähigkeiten des Lebertransplantates erklärbar zu sein. Beobachtungen, wonach lebertransplantierte Patienten, die ihre immunsuppressive Therapie selbst absetzten und überraschenderweise keine Abstoßungsreaktionen zeigten, gaben zur Vermutung Anlass, dass das Immunsystem dieser Patienten tolerant gegenüber dem Lebertransplantat geworden ist. Daraufhin wurde im Rahmen klinischer Studien geprüft, ob nicht auch bei weiteren lebertransplantierten Patienten die immunsuppressiven Medikamente in ihrer Dosierung kontrolliert reduziert oder gar abgesetzt werden können, ohne dabei eine Transplantatabstoßung auszulösen (Ramos H et al., 1995; Devlin J et al., 1998; Takatsuki M et al., 2001).

Aufgrund ihrer einzigartigen Immunologie wird das Lebertransplantat experimentell sehr intensiv untersucht (Übersicht u.a. bei Gassel HJ, Otto C, 2002). Verschiedenste Mechanismen als mögliche Ursache werden dabei kontrovers diskutiert (siehe auch Kapitel 6). Insbesondere von der Arbeitsgruppe um G. Alex Bishop (Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australien) werden intrahepatische „passenger leukocytes“ für die Entstehung von Lebertransplantat-Spontantoleranz verantwortlich gemacht. Hierbei handelt es sich um mit dem Lebertransplantat übertragene Leukozyten wie z.B. dendritische Zellen aber auch Lymphozyten. Wurden diese ortsständigen, in der Leber lokalisierten Zellen vor der Transplantation selektiv durch Bestrahlung zerstört, so wurden die Lebertransplantate nicht mehr spontan akzeptiert, sondern akut abgestoßen (Sun J et al., 1995; Bishop GA et al., 1997).

Hierzu führte die Gruppe ihre Untersuchungen in der Rattenstammkombination PVG-nach-DA durch. Wurden die bestrahlten PVG-Lebern vor ihrer Transplantation jedoch mit lebenden intrahepatischen PVG T-Lymphozyten rekonstituiert, so ließ sich die Spontantoleranz wieder herstellen (Sun J et al., 1995; Sun J et al., 1996). Andererseits werden Lebertransplantate u.a. von T-Lymphozyten des Empfänger-Immunsystems infiltriert. Diese besondere Situation wird im Ergebnisteil näher erläutert (s. Abb. 4.11).

Mosmann et al. unterteilten als erste T-Lymphozyten auf der Basis der von ihnen produzierten Zytokine in Th1 und Th2 Zellen (Mosmann TR et al., 1986). Wie inzwischen an zahlreichen Beispielen gezeigt wurde, erlaubt dieses Konzept die Heterogenität der Immunantwort bei vielen Erkrankungen zu verstehen (Übersicht bei Lohoff M et al., 1998). In der Transplantationsimmunologie wird die Bedeutung von Th2-Zellen für die Induktion von Toleranz kontrovers diskutiert (Lowry RP, Takeuchi T, 1996; Sun J et al., 1994; Farges O et al., 1994; Egawa H et al., 1995; Akdis

CA, Blaser K, 2001). Zwar konnte die Arbeitsgruppe um Miyanari in Lebern langzeitüberlebender Empfängertiere eine Th-2 Population nachweisen, doch wurde ihre Funktion nicht untersucht (Miyanari N et al., 1997). Um aber Lebertransplantat - Spontantoleranz aufzuheben, scheint es notwendig zu sein, das Verhältnis von Th2- zu Th1-Zytokinen zu verändern, z.B. durch Injektion von IL-2 (Tu Y et al., 1997). Auch scheint die in der transplantationsimmunologischen

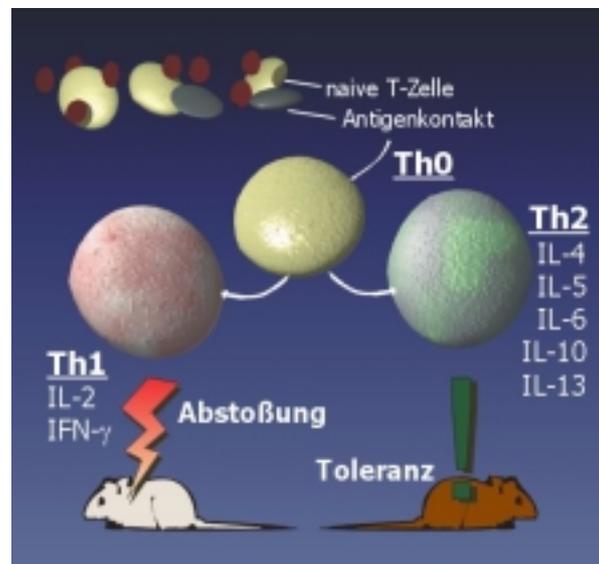


Abb. 1.1: Naive T-Lymphozyten entwickeln sich nach ihrer Aktivierung in sogenannte Th1- oder Th2-Zellen. Inwieweit eine Anwesenheit von Th2 für die Induktion von Spontantoleranz notwendig ist bzw. ihre Abwesenheit zur Transplantat-abstoßung führt, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Literatur gängige Einteilung in "gute" Th2-Zytokine (da sie zumindest die Abstoßung nicht fördern) und "weniger gute" Th1-Zytokine (da sie die Abstoßung auslösen) kein wirklich weiterführendes Konzept zu sein. So ist z.B. das Th1 Zytokin IL-2 zwar ein potenter Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten, doch kann es auch eine T-Zellantwort limitieren, u.a. dadurch, dass die über das Oberflächenmolekül Fas vermittelten apoptotischen Vorgänge forciert werden (Lenardo MJ, 1991; Malek TR, Bayer AL, 2004). Des Weiteren ist IL-2 auch essentiell für die Expansion von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulator T-Lymphozyten (Nelson BH, 2004).

Aktivierte T-Lymphozyten sezernieren nicht nur bestimmte Zytokine, sie zeigen auch Veränderungen in der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, die mit ihrer Funktion korreliert (Powrie F, Mason D, 1989; Powrie F, Mason D, 1990a; Spickett GP et al., 1983).

Von der japanischen Arbeitsgruppe um Ogawa wurden in tolerierten Lebertransplantaten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nachgewiesen, die eine Isoform von CD45R exprimierten (Miyinari N et al., 1997). Dieser Rezeptor wird allgemein als „leukocyte common antigen“ bezeichnet

(Powrie F, Mason D, 1990b). Die Isoformen werden durch alternatives „splicing“ der mRNA hergestellt (s. Abb. 1.2). Sich nicht-teilende („resting“) T-Lymphozyten der Ratte, zu denen neben naiven T-Lymphozyten auch Gedächtniszellen zählen, exprimieren die CD45RC

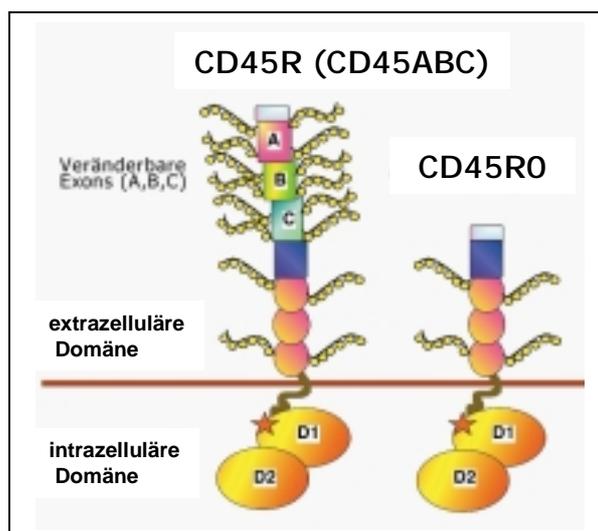
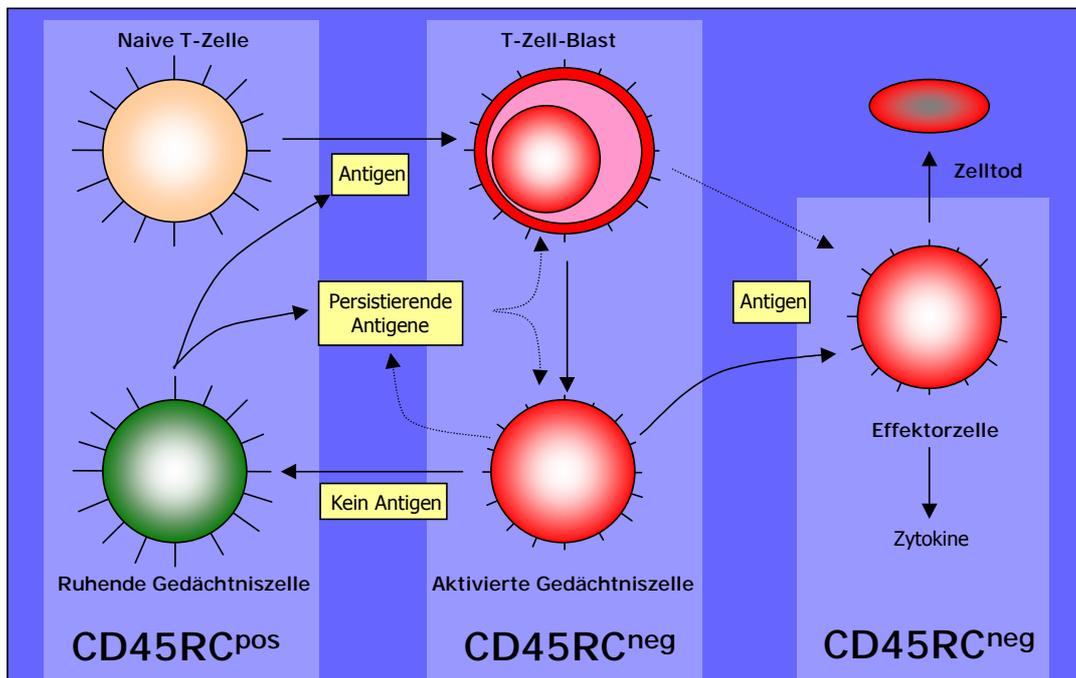


Abb. 1.2: Der CD45-Rezeptor wird in einer hochmolekularen und niedermolekularen Form auf der Zelloberfläche exprimiert (Penninger JM et al., 2001). Die hochmolekulare Form enthält je nach Spezies oder Zelltyp eine der drei Exons A, B oder C. Nur für humane Zellen ist der Antikörper UCHL-1 verfügbar, der die niedermolekulare Form CD45RO erkennt. Bei der Ratte z.B. kann die niedermolekulare Form CD45R<sup>low</sup> nur durch die fehlende Antikörperbindung nachgewiesen werden (= CD45R<sup>neg</sup>).

Isoform. Sie werden deshalb auch als  $CD45R^{pos}$  bezeichnet. Aktivierte T-Lymphozyten der Ratte hingegen exprimieren nicht  $CD45R$ ; sie werden als  $CD45R^{neg}$  bezeichnet (Sarawar SR et al., 1993; Swain SL et al., 1996).

Wie Abb. 1.3 zeigt, ist der Wechsel zwischen der hoch- und niedermolekularen Form von  $CD45R$  reversibel (Sparshott SM, Bell EB, 1994). So wandeln sich bei einem ausbleibenden Antigenkontakt die aktivierten  $CD45R^{neg}$  Zellen in ruhende  $CD45R^{pos}$  Zellen um (Bunce C, Bell EB, 1997), während ein erneuter Kontakt mit dem Antigen zu ihrer Reaktivierung führt (Subra JF et al., 2001).



**Abb. 1.3:** T-Lymphozyten exprimieren eine der Formen von  $CD45R$  (nach Bell EB et al., 1998). Naive T-Lymphozyten, die exprimieren die hochmolekulare Form von  $CD45R$  ( $CD45R^{pos}$ ), werden durch Antigenkontakt aktiviert. Neben dem Interleukin-2-Rezeptor (siehe auch Kapitel 4.4.1) exprimieren aktivierte T-Lymphozyten auch die niedermolekulare Form von  $CD45R$  ( $CD45R^{neg}$ ). Als Effektorzellen sezernieren sie entweder  $Th1$ - oder  $Th2$ -Zytokine (s. Abb. 1.1). Im weiteren Verlauf der Immunantwort wird der Großteil dieser Zellen durch Apoptose eliminiert, während sich ein kleiner Teil in Gedächtniszellen umwandelt. Nach Bell et al. lassen sich dabei zwei Populationen an Gedächtniszellen unterscheiden, für die wiederum eine der beiden Isoformen von  $CD45R$  charakteristisch ist (s. Abb. 1.2). Diese durch das Antigen vermittelte Umwandlung sichert die Antigen-spezifische Immunität.

---

Mit der Möglichkeit, auch T-Lymphozyten der Ratte nach ihrem Zytokinprofil und dem CD45R-Isotyp zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit damit begonnen, intrahepatische T-Lymphozyten nach Lebertransplantation zu typisieren. Dabei soll nach einer Arbeitshypothese der eigenen Gruppe Lebertransplantat-Spontantoleranz auf der Präsenz regulatorischer T-Lymphozyten in spontantoleranten Lebern basieren. Diese Möglichkeit wurde bisher nur wenig untersucht. In dieser Arbeit wurden deshalb die intrahepatischen T-Lymphozyten auf ihr Zytokinprofil (Th1/Th2 Zytokine) und auf das Vorhandensein von CD45RC hin analysiert. Mit diesem experimentellen Design sollte überprüft werden, ob aus der frühen Aktivierung nach Lebertransplantation - je nach Präsenz von Th1- oder Th2-Zellen - entweder destruktive Immunantworten (= Abstoßung) oder tolerogene Immunantworten (= Spontantoleranz) entstehen.

---

## 2. Fragestellung

---

Das Zytokinprofil und der Phänotyp isolierter T-Lymphozyten aus Lebertransplantaten während Abstoßung und Spontantoleranz wurden in dieser Arbeit untersucht. Die Beantwortung folgender Fragen stand dabei im Mittelpunkt:

- 1) Dominieren bei Lebertransplantat-Spontantoleranz Th2-Zytokine und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt nach Transplantation? Und finden sich in der Phase der Abstoßung überwiegend Th1-Zytokine und ab welchem Zeitpunkt?
- 2) Sind  $CD4^+$  T-Lymphozyten während Abstoßung und Spontantoleranz  $CD45RC^{pos}$  oder  $CD45RC^{neg}$ ?
- 3) Ist die kombinierte Analyse von Zytokinen und Oberflächenmolekülen aussagekräftig genug, um eine T-Zellpopulation zu identifizieren, die jeweils für Abstoßung oder Spontantoleranz entscheidend ist?

---

## 3. Material und Methoden

---

### 3.1. Versuchstiere

#### *Herkunft und Haltung*

Als Versuchstiere wurden folgende Inzuchtstämme verwendet:

1. **Dark Agouti (DA):**

MHC Haplotyp RT1<sup>uvl</sup>; Fa. Harlan – Winkelmann GmbH, Borcheln

2. **Lewis (LEW):**

MHC Haplotyp RT1<sup>l</sup>; Fa. Charles River GmbH, Sulzfeld

3. **Brown Norway (BN):**

MHC Haplotyp RT1<sup>n</sup>; Fa. Charles River GmbH, Sulzfeld

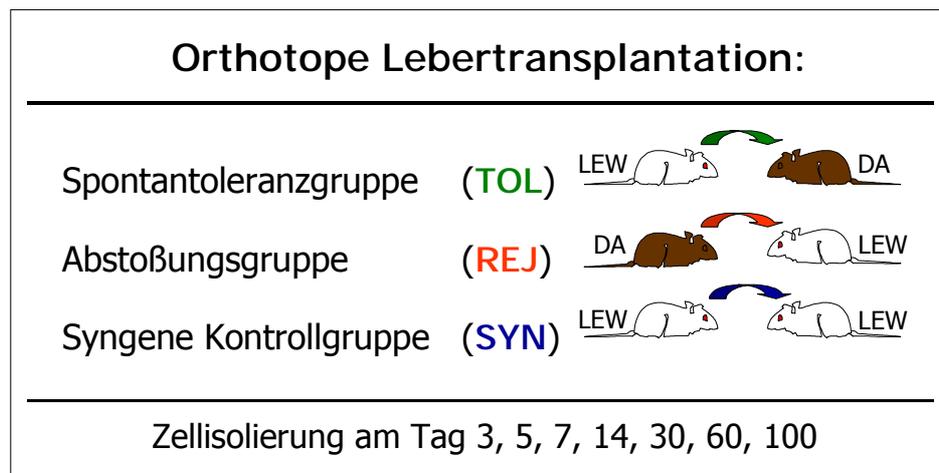
Die Operationen erfolgten an 200-250 g schweren männlichen Ratten, die in Lamina-air-flow-Schränken (Scanbur, Koge, Dänemark) in Makrolon<sup>®</sup>-Käfigen mit Einstreu gehalten wurden. Zur Ernährung erhielten die Tiere Altromin<sup>®</sup>-Pressfutter und Wasser ad libitum.

#### *Zusammenstellung der Versuchsgruppen*

Die Lebertransplantation wurde in drei verschiedenen Stammkombinationen durchgeführt (s. Abb. 3.1). In der allogenen Kombination DA-nach-LEW erhielten LEW-Empfänger MHC-differente Lebertransplantate von DA-Tieren. Ohne Immunsuppression wurden diese innerhalb von 9-14 Tagen akut abgestoßen (s. auch Engemann R et al., 1987). Diese Kombination wurde deshalb als Abstoßungs- oder Rejektionsgruppe (REJ) bezeichnet.

In der reziproken Stammkombination LEW-nach-DA wurden MHC-differente LEW-Lebertransplantate von DA-Empfängern spontan, d.h. ohne Immunsuppression, langfristig akzeptiert (Farges O et al., 1994). Da diese Langzeitakzeptanz auf transplantatspezifischer Toleranz beruhte, wurde diese Kombination als Spontantoleranzgruppe (TOL) bezeichnet.

Zur Kontrolle wurden Lebertransplantate zwischen LEW-Tieren syngen transplantiert (Syngene Kontrollgruppe, SYN), um die durch die Operation ausgelösten immunologischen Veränderungen von der durch die Transplantatantigene induzierten Immunantwort in den beiden allogenen Gruppen zu unterscheiden. Jeweils drei Tiere aus diesen drei Versuchsgruppen wurden an den postoperativen Tagen 3, 5, 7, 14, 30, 60 und 100 analysiert (s. Abb. 3.1).



*Abb. 3.1: Übersicht über die Versuchsgruppen zur orthotopen Lebertransplantation und die einzelnen Isolierungstage. Pro Gruppe und Versuchstag wurden jeweils mindestens drei Tiere unabhängig von einander analysiert, d.h. die jeweils isolierten intrahepatischen Leukozyten wurden nicht vermischt.*

## 3.2. Die orthotope arterialisierte Lebertransplantation

### *Allgemeine Bedingungen*

Die orthotope Lebertransplantation wurde in keimarmer Umgebung am Operationsmikroskop (Fa. Codman Typ Mentor III, Herbruggen, Schweiz) in 10- bis 15-facher Vergrößerung des Operationssitus durchgeführt. Die Anästhesie erfolgte als Inhalationsnarkose mit Isofluran<sup>®</sup>. Die Gefäße wurden in Standardnahttechnik mit monofilen, nicht resorbierbaren Fäden der Stärken 6-0 bis 9-0 (Prolene<sup>®</sup>, Ethilon<sup>®</sup>, Fa. Ethicon, Hamburg) anastomosiert (Gassel HJ, Steger U, 1998).

---

Der Bauchdeckenverschluss erfolgte in zweischichtiger Einzelknopf-Nahttechnik mit 4-0 Prolene® (Fa. Ethicon). Als Polyäthylen-Splint für die Gallenganganastomose wurden 22G Braunülen (Fa. Braun, Melsungen) verwendet, die mit einer 6-0 Seidenligatur (NC-Seide, Fa. Braun) im Gallengang fixiert wurden.

*Spenderoperation:*

Bei der Rattenlebertransplantation wurde auf eine modifizierte Variante (Gassel HJ, Steger U, 1998) mit Reanastomisierung der Arteria hepatica der ursprünglich von Lee beschriebenen Technik zurückgegriffen (Lee S et al., 1973). Nach der Rasur des Spendertieres und Desinfektion erfolgte die Öffnung des Abdomens über eine mediane Laparotomie. Die Leber wurde aus ihren bindegewebigen Strukturen präpariert. Im Anschluß wurden Vena phrenica sinistra, die Arteria und Vena suprarenalis dextra ligiert und durchtrennt, danach zunächst Pylorus- und Milzvene an der Leberpforte ligiert und von der Vena portae abgetrennt. Nach Freipräparierung und Absetzung des Ductus choledochus wurde der Splint eingebracht und fixiert. Es folgte die Präparation und Mobilisierung der Aorta von der Iliacalbifurkation bis zum Truncus coeliacus. Zusätzlich wurden die A. lienalis und A. gastrica sinistra mit Ligaturen versehen und durchtrennt. Über die Pfortader und das nach proximal ligierte abdominale Aortensegment via Truncus coeliacus wurde die Spenderleber mit 4° C kalter physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Die kalte Ischämiezeit betrug zwischen 50 bis 80 Minuten.

*Empfängeroperation:*

Für die Explantation wurde die Leber wie oben beschrieben mobilisiert. Danach wurden Pylorusvene und A. hepatica propria ligiert und durchtrennt. Nach Ausklemmen der Leber erfolgte die Hepatektomie durch hilus- bzw. lebernahe Durchtrennung von Ductus choledochus, Vena portae sowie infra- und suprahepatischer Vena cava.

---

Die Implantation des Spenderorgans erfolgte in der nun dargestellten Reihenfolge: zunächst wurde die End-zu-End-Anastomose der Vena cava inferior suprahepatisch und die End-zu-End-Anastomose der Vena portae transluminal fortlaufend genäht. Anschließend wurden die entsprechenden Klemmen geöffnet, womit der Pfortaderkreislauf entlastet und die anhepatische Phase nach ca. 15-20 Minuten beendet wurde. Danach wurde die End-zu-End-Anastomose der Vena cava inferior infrahepatisch gesetzt und das Spender-Aortensegment an die infrarenale Empfänger-Aorta mit einer End-zu-Seit-Anastomose angeschlossen. Der Gallengangsplint wurde nun in den Empfänger-Gallengang eingefügt und durch Einzelknopfnähte fixiert. Die Operationszeit betrug bei Spender und Empfänger jeweils 50 bis 60 Minuten. Verstarben Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden nach Operation, wurden sie von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Diese operationsbedingte Ausschussrate am Gesamtkollektiv lag unter 3 Prozent.

### 3.3. Die heterotope Herztransplantation

Um zu überprüfen, ob die in der Spontantoleranzgruppe beobachtete Langzeitfunktion der Lebertransplantate auf spenderspezifischer Toleranz beruhte (siehe auch Kapitel 3.1), erhielten langzeitüberlebende Tiere um den Tag 100 nach Lebertransplantation ein heterotopes Herztransplantat vom Lebertransplantat-Spenderstamm (LEW), bzw. von einem Drittstamm (Brown Norway, BN).

#### *Spenderoperation*

Nach Rasur und Desinfektion erfolgte der operative Zugang durch eine Sternotomie. Danach wurden Vena cava inferior und superior sowie der Truncus pulmonalis unterfahren und ligiert, die Aorta ascendens und der Truncus pulmonalis durchtrennt. Durch Absetzen der ligierten Gefäße konnte das Herz entnommen werden. Bis zur Implantation wurde das Transplantat in 4° C kalter NaCl-Lösung aufbewahrt.

---

### *Empfängeroperation*

Als Empfänger dienten Tiere der Spontanoleranzgruppe (TOL) und Syngenen Kontrollgruppe (SYN), die 100 Tage zuvor ein Lebertransplantat erhalten hatten. Nach Rasur, Desinfektion und Laparotomie wurden bei diesen Tieren zunächst einige Verwachsungen gelöst, um die Empfänger-Aorta und Vena cava inferior infrarenal darstellen zu können. Aorta ascendens und Truncus pulmonalis des Spenderherzens wurden mittels End-zu-Seit-Anastomose an die Empfänger-Aorta bzw. Vena cava inferior des Empfängers angeschlossen. Hierbei wurde ein retrograder Blutstrom durch die Aorta über die Koronargefäße in den rechten Vorhof und die rechte Herzkammer und von dort über die Arteria pulmonalis in die Empfängervene erreicht. Mit Einsetzen der Perfusion kam es spontan zur Funktionsaufnahme des Transplantats. Nach Verschluss der Bauchdecke konnte die Herzaktion perkutan ertastet werden.

## 3.4. Die Hauttransplantation

Neben dem Herztransplantat erhielten weitere langzeitüberlebende Tiere zum gleichen Zeitpunkt ein Hauttransplantat, das ebenfalls vom Lebertransplantat-Spenderstamm (LEW), bzw. vom Drittstamm (BN) stammte. Dieses Transplantat war auf Grund seines Anteils an dendritischen Zellen (Langerhans'sche Zellen) im Vergleich zum Herzen wesentlich immunogener. Am Bauch des Spendertieres wurde nach gründlicher Rasur und Desinfektion ein 1 cm<sup>2</sup> großes Vollhauttransplantat entnommen. Nach Entfernung eines identischen Areals beim Empfängertier wurde das Transplantat an entsprechender Stelle eingepaßt und mit einigen 4-0 Prolene<sup>®</sup>-Einzelknopfnähten fixiert. Mit Hilfe eines fünftägigen Druckverbandes wurden die Tiere an einer Selbstmanipulation gehindert. Nach Abnahme des Verbandes erfolgte die tägliche Inspektion.

---

### 3.5. Durchführung der Organentnahme

Nach Rasur und Hautdesinfektion erfolgte eine mediane Laparotomie, bei der als Zugang die alte Operationsnarbe gewählt wurde. Der intraabdominelle Befund wurde protokolliert. Hierbei wurde insbesondere auf makroskopische Entzündungszeichen oder Organverwachsungen geachtet. Anschließend wurde die Anatomie des Lebertransplantates dargestellt (V.cava inf., V. portae, A. hepatica, Ductus choledochus) und die Durchgängigkeit der Anastomosen geprüft. Die V. cava inferior wurde suprahepatisch eröffnet und die Portalvene ausgeklemmt. Mittels einer Längsinzision dieses Gefäßes erfolgte dann die Perfusion des Transplantates über eine 22g Braunüle mit NaCl-Lösung (ca. 10 ml, 4°C) *in vivo*, um zu gewährleisten, dass für die weiteren Analysen nur die ortsständigen Leukozyten verwendet wurden. Das Organ wurde bei Blutleere durch Absetzen der restlichen Anastomosen explantiert. Danach wurde die Milz entnommen. Alle zu- und abführenden Gefäße wurden hierzu ligiert und durchtrennt. Anschließend wurden die Tiere durch eine intracardiale T-61 Injektion getötet. Beide explantierten Organe wurden unmittelbar nach ihrer Entnahme bis zur Weiterverarbeitung in RPMI-1640 Kulturmedium aufbewahrt.

### 3.6. Histologische Untersuchungen

Zur histologischen Beurteilung der Leber wurde ein ca. 0,5 cm<sup>3</sup> großes Stück in 4%-igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die 3 µm dicken Schnitte (Schneidegerät: Histoslide 2000 R, Jung; Leica, Nussloch) wurden mit Hämatoxilin-Eosin (H&E) gefärbt (Wissozky N, 1877; Ehrlich P, 1886). Die Beurteilung der Abstoßung erfolgte nach dem in Abb. 3.2 dargestellten vierstufigen Grading (Ormond DG et al., 1999).

<i>Grad 0:</i>	Keine Anzeichen einer Abstoßung
<i>Grad I:</i>	Geringgradige, lymphozytäre periportale Infiltration, minimale Endothelitis & Einzelzellnekrosen, keine Parenchymnekrosen
<i>Grad II:</i>	Ausgeprägte periportale Infiltration mit Überschreitung der Grenzlamelle der Periportalfelder, mäßig ausgeprägte Leberzellnekrosen
<i>Grad III:</i>	Weiter ausgedehnte periportale Infiltration, konfluierende Leberzellnekrosen

*Abb. 3.2: Einteilung der Abstoßungsreaktion von Lebertransplantaten*

### 3.7. Isolierung von Leberleukozyten

Die entnommene Leber (ihr Gewicht wurde protokolliert) wurde mit einem Skalpell in kleine Stücke zerteilt und anschließend durch ein Sieb (Fa. Sigma, Deisenhofen) gepreßt. Die Zellsuspension wurde in 20 ml PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) aufgenommen und für 7 Minuten bei 572 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen und Gewebetrümmer erneut mit 20 ml PBS aufgenommen und für 30 Minuten bei 37° C in einem Schüttelwasserbad bei einer Frequenz von 80 U/min inkubiert. Der Inkubationslösung wurden 100 U/ml (Endkonzentration) Kollagenase Typ IV (Fa. Sigma, Deisenhofen) und 0,001% (Endkonzentration) DNase I (Fa. Roche Diagnostik GmbH, Mannheim) zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Hepatozyten durch mehrmaliges Vorzentrifugieren bei 50 xg für 2 Minuten (ohne Bremse) sedimentiert.

---

Der Überstand mit den Leberleukozyten wurde über Gaze mit einer Porengröße von 100 µm (Fa. Hartenstein, Würzburg) filtriert, um Gewebestücke abzutrennen. Die abzentrifugierten Leberleukozyten wurden mit 20 ml steriler 36%-iger Percoll-Lösung (Fa. Amersham Pharma Biotech, Freiburg) aufgenommen und vorsichtig auf 20 ml sterile 72%-ige Percoll-Lösung pipettiert. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 1.104 xg und 20° C zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen blieben Hepatozyten und Zellbruchstücke an der Oberfläche des Gradienten und konnten so entfernt werden. Die Leukozyten bildeten eine ringförmige Interphase zwischen beiden Percoll-Lösungen. Diese wurden mit der Pipette abgenommen und die Zellsuspension wurde ein weiteres Mal über Gaze filtriert, mit PBS versetzt und zentrifugiert. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen in einer Zählkammer bestimmt, ohne die nicht-vitalen Zellen (sie färbten sich mit Trypan-Blau an) mitzuzählen. Für die T-Zellisolierung wurde die Zellsuspension auf  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml PBS eingestellt.

### 3.8. Isolierung von Milzleukozyten

Die Milz wurde durch ein Kunststoffsieb (Cellstrainer, 70 µm, Fa. Falcon) gepreßt und mit PBS versetzt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (bei 397 xg, 20° C für 7 Minuten) und die Erythrozyten mit 5 ml Lysepuffer (22,5 g Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl), 2,5 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>), 925 mg EDTA) zerstört. Nach 2 Minuten wurde dieser Vorgang durch Verdünnung mit 20 ml PBS gestoppt und die Gewebereste durch Filtration über Gaze (Porengröße 100 µm) abgetrennt. Die Milzleukozyten wurden in 1 ml RPMI 1640 aufgenommen und auf eine Nylonwoll-Säule pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die T-Lymphozyten vorsichtig eluiert (ca. 1 Tropfen/sec.), während die antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen und B-Lymphozyten, an den Nylonfäden adhärirten. Die angereicherten T-Lymphozyten wurden gewaschen und ebenfalls auf  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml eingestellt.

---

### 3.9. Durchflußzytometrische Phänotypisierung von Leber- und Milzleukozyten

#### *Färbeprotokoll*

Die aus Lebertransplantaten und Milzen isolierten Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll gefärbt. Jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen (in 50  $\mu$ l PBS) wurden in einem ersten Schritt mit den jeweiligen FITC-konjugierten Maus-anti-Ratte-Antikörpern (s. Abb. 3.4) für 20 Minuten bei 4° C inkubiert. Hierzu wurden in Vorversuchen die optimalen Antikörper-Konzentrationen bestimmt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem PE-konjugierten Primärantikörper inkubiert (s. Abb. 3.4), zweimal gewaschen und zum Schluss mit 300  $\mu$ l PBS aufgenommen. Wurden die beiden unkonjugierten Antikörper MN4 und NDS60 verwendet, so wurden die Zellen in einem zweiten Schritt mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper (Esel-anti-Maus) und anschließend mit Mausserum (Endverdünnung: 1:50) inkubiert. Dazwischen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und abschließend mit einem der beiden PE-konjugierten Antikörper inkubiert. Die Qualität der Absättigung wurde mit einer Isotypenkontrolle (Pharmigen) überprüft. Danach wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS in 300  $\mu$ l PBS aufgenommen und im Durchflußzytometer gemessen.

Antikörper	Epitop	Zielzellen	Konjugat	Herkunft
OX-1	CD45	alle Leukozyten	FITC	Serotec, über Linaris, Wertheim
W3/25	CD4	T-Helfer-Zellen, Makrophagen	PE	Serotec
OX-8	CD8 $\alpha$	Zytotoxische T-Lymphozyten, NK-Zellen	PE	Serotec
R73	$\alpha/\beta$ -TCR*	$\alpha/\beta$ -T-Lymphozyten	PE	Serotec
ED-2	CD163	Makrophagen	FITC	Serotec
OX-33	CD45RB	B-Lymphozyten	FITC	Serotec
OX-22	CD45RC	u.a. CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	FITC	Serotec
OX-39	CD25	Aktivierte T-Lymphozyten	FITC	Serotec
MN4	MHC I	MHC-Klasse I-Antigen (spezifisch für den RT1 <sup>uVl</sup> -Haplotyp; z.B. in der DA-Ratte zu finden)	∅	Serotec
NDS60	MHC I	MHC-Klasse I-Antigen (spezifisch für den RT1 <sup>l</sup> -Haplotyp; z.B. in der LEW-Ratte zu finden)	∅	Dr. M. Dallmann, Oxford, England

*Abb. 3.4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper, ihre Spezifität und Bezugsquelle. Als FITC-konjugierter Sekundärantikörper wurde der „Esel-anti-Maus“ – Antikörper von Jackson Immuno Research (über dianova, Hamburg) verwendet. Alle Zellproben wurden zusätzlich mit 7AAD auf ihre Vitalität überprüft (\* TCR=T-cell receptor, T-Zellrezeptor).*

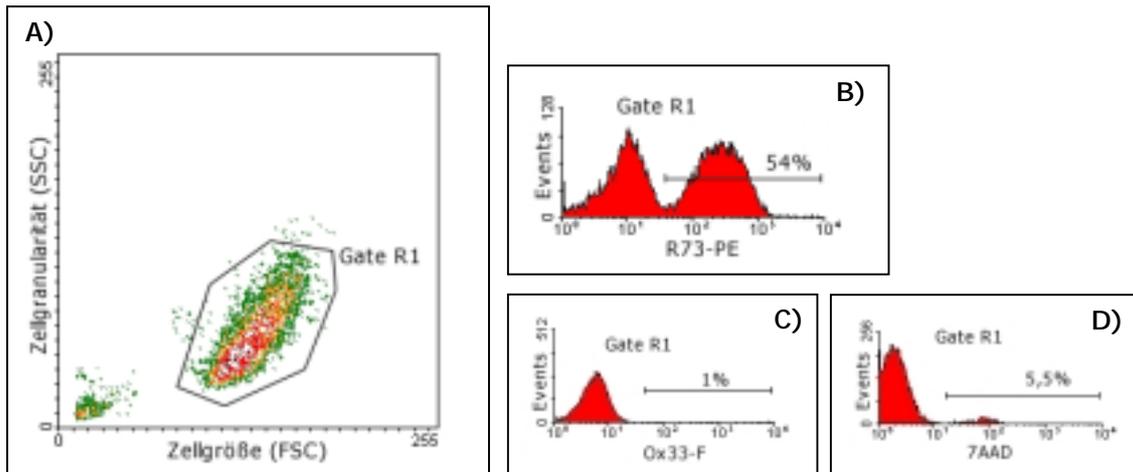
### Meßprinzip

Die durchflußzytometrische Untersuchung ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension und wurde mit dem FACScan der Fa. Becton Dickinson (Heidelberg) durchgeführt. Sie basiert auf der Messung von verschiedenen optischen Signalen, wie das von den Zellen verursachte Streulicht und das durch gebundene, farbstoffkonjugierte Antikörper (s. Abb. 3.4) ausgelöste Fluoreszenzlicht. Hierzu passieren die Zellen hintereinander einen Laserstrahl, bei diesem Gerät einen Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm.

---

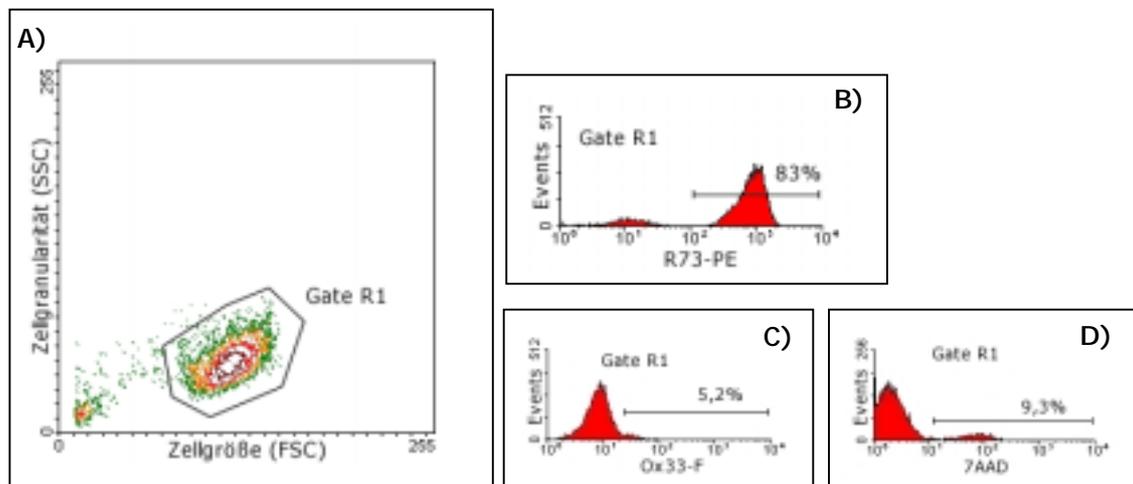
Das Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Light Scatter, FSC) gibt Auskunft über die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Light Scatter, SSC) von der Granularität der Zellen abhängt. Die Möglichkeit mit einem Durchflußzytometer Fluoreszenzlicht zu messen, erlaubt die Bestimmung einer Vielzahl von Merkmalen, wie z.B. den Nachweis verschiedenster Oberflächenmoleküle über bestimmte farbstoffgekoppelte Antikörper (s. Abb. 3.4). Hierzu werden bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, wie z.B. Fluoresceinisothiozyanat (Grünfluoreszenz, Emissionsmaximum bei 530 nm) oder Phycoerythrin (Rotfluoreszenz, Emissionsmaximum bei 585 nm). Das Streu- und Fluoreszenzlicht wird von verschiedenen Detektoren aufgefangen und nach Intensität und Farbe getrennt digital gespeichert. So wird für jede einzelne Zelle eine charakteristische Kombination von optischen Eigenschaften aufgezeichnet, nämlich FSC, SSC und bis zu drei Fluoreszenzsignale.

Bei jedem Messvorgang wurden 10.000 positive Zellen gezählt und die so gewonnenen digitalen Daten mit dem Programm WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, The Scripps Research Institute) statistisch und graphisch ausgewertet. Aus diesen Datensätzen wurde mit Hilfe von OX-1 die Leukozytenpopulation herausgefiltert. Die weiteren Analysen erfolgten in diesem „gate“ (s. Abb. 3.5 und Abb. 3.6).



**Abb. 3.5:** „Leukozytengate“ (R1) als Grundlage für die Auswertung der verschiedenen Zellgruppen in der Leber nach Anreicherung über Percoll. **A)** FSC – SSC – Diagramm; hier wurde die Zellgröße (FSC) gegen die Granularität (SSC) aufgetragen. **B-D)** Darstellung der Fluoreszenz-Intensitäten im Histogramm: **B)** Färbung mit dem anti- $\alpha\beta$  TCR Antikörper R73. **C)** Färbung mit dem B-Lymphozyten Antikörper Ox-33. **D)** Färbung mit 7AAD, um den Anteil toter Zellen zu bestimmen.

Entsprechend wurden auch, wie Abb. 3.6 zeigt, die Milzleukozyten analysiert.



**Abb. 3.6:** „Leukozytengate“ (R1) als Grundlage für die Auswertung der Milzleukozyten nach Inkubation über die Nylonwolle (s. Kap. 3.8). **A)** FSC – SSC – Diagramm; hier wurde die Zellgröße (FSC) gegen die Granularität (SSC) aufgetragen. **B)** Darstellung der Fluoreszenz-Intensität im Histogramm: **B)** Färbung mit dem anti- $\alpha\beta$  TCR Antikörper R73. **C)** Färbung mit dem B-Lymphozyten Antikörper Ox-33. **D)** Färbung mit 7AAD, um den Anteil toter Zellen zu bestimmen.

---

### 3.10. Aufreinigung der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus Leber und Milz

Um die immunbiologischen Analysen mit reinen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten durchführen zu können (Abschnitt 3.11), wurden diese aus den Leber- und Milzleukozyten isoliert. Hierfür wurde folgendes Protokoll erarbeitet: Vor der eigentlichen Isolierung der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurde das Zellgemisch mit Rattenserum für 20 Minuten bei 4°C inkubiert (pro 1x10<sup>6</sup> Zellen 1µl Serum) und danach mit magnetischen Partikeln „Dynabeads“ (CELLlection<sup>®</sup> Pan Mouse IgG Kit, pro 1ml Zellsuspension 25 µl Beads) versetzt. Hierüber wurden Fc-Rezeptor exprimierende Zellen entfernt.

Die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden in zwei Schritten aus den intrahepatischen Leukozyten und Milzleukozyten isoliert: Als Erstes wurden alle Ox8-positiven Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen) entfernt, um als Zweites im Anschluss daran die verbliebenen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit dem monoklonalen Antikörper R73 (anti-αβ TCR) zu selektieren. Hierzu wurden die Leukozyten für 30 Minuten bei 4°C mit dem Antikörper OX-8 (0,3 µg mAk pro 10<sup>6</sup> positive Zellen) inkubiert. Nach Auswaschen der nichtgebundenen Antikörper wurden vier Dynabeads pro Zielzelle zugesetzt, für 15 Minuten bei 4° C inkubiert und die konjugierten OX8<sup>+</sup> Zellen mit dem Magneten (DynaL MPC<sup>®</sup>) aus der Zellsuspension gezogen. Die noch vorhandenen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden danach mit R73 positiv selektiert (s. Abb. 3.8). Die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden von den Dynabeads entfernt, indem die Zellen mit 166 µg DNase I (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in 200 µl RPMI 1640 Kulturmedium bei 37°C inkubiert wurden. Die Zellprobe wurde nach 20 Minuten in den Magneten platziert, die Zellen wurden so von den abgespaltenen Dynabeads getrennt und gezählt. Die Abb. 3.7 zeigt die anschließende durchflußzytometrische Überprüfung der Reinheit (im Durchschnitt >95%).

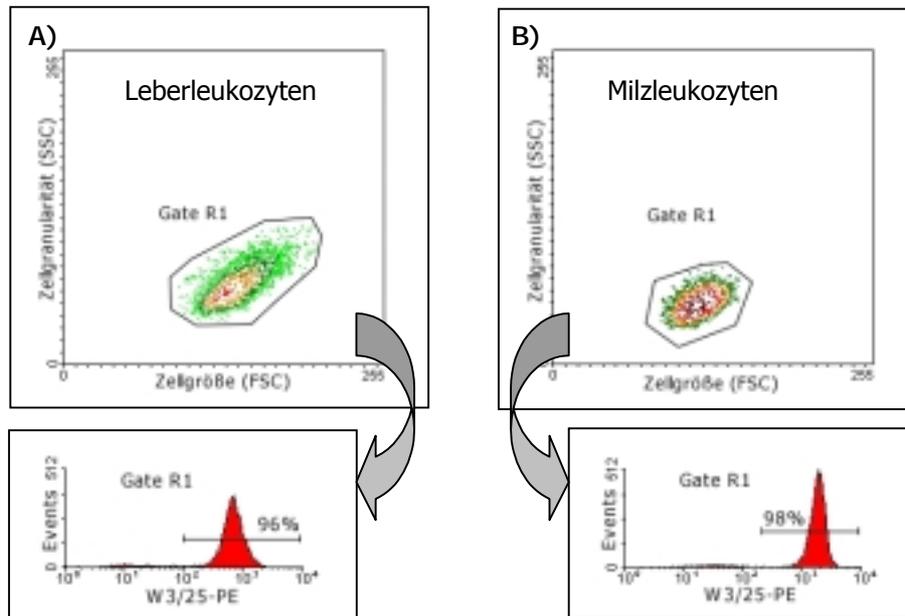


Abb. 3.7: Die Reinheit der isolierten  $CD4^+$  T-Lymphozyten nach der Selektion: Verteilung der Zellen im FSC-SSC-Diagramm und Histogramm der aufgereinigten  $CD4^+$  T-Lymphozyten aus A) Leber und B) Milz. Für die T-Lymphozyten aus beiden Organen wurden Reinheiten von über 95% für die anschließenden Versuche erzielt.

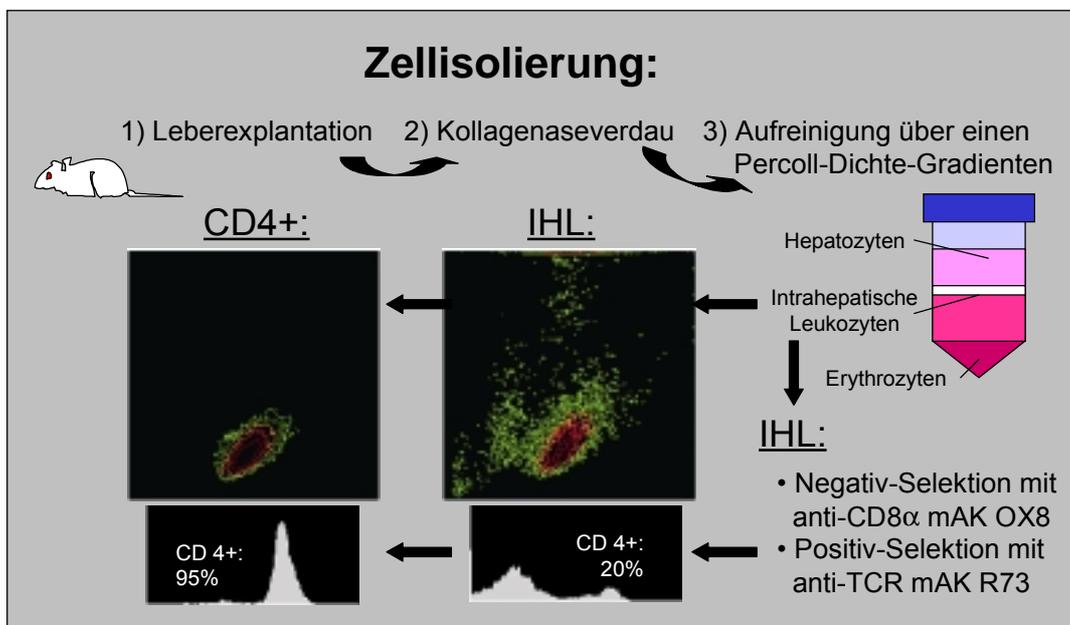


Abb. 3.8: Schema des Protokolls zur Zellisolierung. IHL: Intrahepatische Leukozyten, mAK: monoklonaler Antikörper.

---

### 3.11. Immunbiologische Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus Leber und Milz

Die in hoher Reinheit (>95%, s. Abb. 3.7) isolierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden *in vitro* stimuliert, um so Aussagen über ihre Funktion treffen zu können. Die in den Kulturüberstand sezernierten Interleukine wurden mit ELISA-Technik bestimmt. Nach Ende der Inkubation wurde die mRNA aus diesen Zellen für RT-PCR Analysen isoliert.

#### 3.11.1. Stimulierung *in vitro*

Von den mit R73 isolierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (s. Kapitel 3.10) wurden  $6 \times 10^5$  Zellen mit 1 µg des Antikörpers JJ319 (αCD-28, Fa. Serotec, England) für 15 Minuten bei 4° C inkubiert und mit  $1 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung auf einer 96er Mikrowell-Platte (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verteilt. Zusammen mit dem plattengebundenen Ziege-anti-Maus Antikörper (30 µg/ml, Fa. Serotec, England) wurden die Zellen für drei Stunden bei 37° C und 6% CO<sub>2</sub> in einem Endvolumen von 200 µl stimuliert. Das RPMI 1640 Medium enthielt 10% hitzeinaktiviertes FCS, 5 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin,  $2 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol, 1 mM Natrium-Pyruvat und 1% nicht-essentielle Aminosäuren (alle Reagenzien von Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe). Als Negativkontrolle dienten isolierte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die zwar mit JJ319 inkubiert wurden, der aber nicht dem Ziege-anti-Maus Antikörper quervernetzt war; d.h. die Vertiefungen der 96 Mikrowell-Platte waren nicht mit diesem Antikörper beschichtet. Als Positivkontrolle wurde Ionomycin mit einer Endkonzentration von 500 ng/ml und PMA mit einer Endkonzentration von 10 ng/ml (beide Reagenzien von der Fa. Serotec, England) den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zugesetzt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert (s. Abb. 3.9)

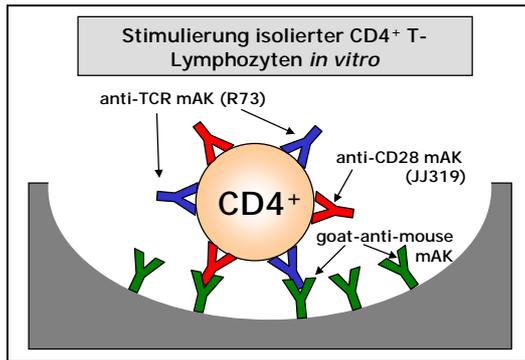


Abb. 3.9: Schema der *in-vitro* Stimulierung aufgereinigter  $CD4^+$  T-Lymphozyten. Hierzu wurden die mit R73 und JJ319 inkubierten Zellen auf Ziege-anti-Maus-beschichtete Zellkulturplatten verteilt (mAK: monoklonaler Antikörper, TCR: T-cell-Rezeptor, T-Zellrezeptor).

### 3.11.2. Zytokin-Nachweis im ELISA

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein etabliertes Analyseverfahren zum Nachweis bestimmter Proteine und basiert auf der Antikörper-Antigen-Reaktion. Für den hier durchgeführten Sandwich-ELISA sind zum Nachweis von Zytokinen jeweils zwei „passende“ Antikörper notwendig. Der an die ELISA-Platte fixierte Antikörper bindet „seine“ Antigene und sorgt dafür, dass sie nicht zusammen mit den nicht-gebundenen Antigenen herausgewaschen werden. In einem zweiten Schritt wird erst ein Biotin-konjugierter Antikörper und anschließend Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben. Dieses Enzym steuert eine Reaktion, die zu einem sichtbaren Farbniederschlag führt, der proportional zur Menge an gebundenem Antigen ist.

In den Kulturüberständen von nicht-stimulierten und *in vitro* stimulierten  $CD4^+$  T-Lymphozyten (jeweils  $6 \times 10^5$  Zellen) wurden nach dem Ablauf der Inkubationszeit von 3 Stunden die Konzentrationen von IL-2 und IL-4 bestimmt. Für diese Messungen wurden BioSource Cytoscreen-ELISA-Kits (Fa. Biosource Int. Inc., Camarillo, CA, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Nachweisgrenze für IL-2 lag bei 5 pg/ml und für IL-4 bei 2 pg/ml. Die Farbintensität wurde als optical density (OD) bei 450 nm mit einem ELISA-Reader (Dynatech Microplate Reader MRX) gemessen.

---

### 3.11.3. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR) dient zur selektiven Anreicherung bestimmter Sequenzen aus einem mRNA-Gemisch. Bei dieser Methode werden zuerst die mRNA-Moleküle durch das Enzym „Reverse Transkriptase“ in cDNA umgeschrieben, aus der mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase, z.B. mit der Taq-Polymerase, die gewünschten Sequenzen spezifisch amplifiziert wurden. Somit können aktivierte Gene nachgewiesen werden.

Aus  $6 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurde mit TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers die Gesamt-RNA isoliert. Die luftgetrocknete RNA wurde in 40 µl 1mM Natriumcitrat, pH 6,4, gelöst (Fa. Ambion, AMS Biotechnology, Wiesbaden) und jeweils 5 µl für die cDNA-Synthese mit dem GeneAmp RNA-PCR-Kit (Fa. Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) eingesetzt. In einem Endvolumen von 20 µl befanden sich: 1x PCR-Puffer II (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP-Gemisch (jeweils 1mM), 1 U/µl RNase-Inhibitor, 2,5 U MuLV Reverse-Transkriptase, 2,5 µM d(T)<sub>16</sub> Oligonukleotide (alle Angaben als Endkonzentrationen). Für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion wurde jeweils 5 µl cDNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten waren: 1x PCR-Puffer II; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 U AmpliTaq DNA-Polymerase und jeweils 0,5 µM der entsprechenden Primer (alle Angaben als Endkonzentrationen) (s. Abb. 3.10). Sämtliche Primer wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert. Folgender PCR-Cyclus wurde 35-mal im PCR-Cylcer (Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2400) wiederholt: 95°C (30s) Schmelztemperatur, Trennung der Doppelstränge der Matrizen-DNA; 55-62°C (30s) Annealing-Temperatur der Primer (s. Abb. 3.10); 72°C (40s) Primerextension, Temperaturoptimum der Taq-Polymerase.

Primer	bp	Temp.		Sequenz 5´ → 3´
IL-2	351	62	For	GCG CAC CCA CTT CAA GCC CT
			Rev	CCA CCA CAG TTG CTG GCT CA
IL-4	275	62	For	ATG CAC CGA GAT GTT TGT ACC
			Rev	TTT CAG TGT TGT GAG CGT GGA
IL-10	371	55	For	TCC ATC CGG GGT GAC AAT AAC
			Rev	AAT CAT TCT TCA CCT GCT CC
IL-13	280	55	For	CAG GGA GCT TAT CGA GGA GC
			Rev	AAG TTG CTT GGA GTA ATT GAG C
GAPDH	319	62	For	GGT CGG TGT GAA CGG ATT TG
			Rev	GTG AGC CCC AGC CTT CTC CAT

*Abb. 3.10: Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide („primer“). Angabe der Produktlänge in bp = Basenpaare; Temp. = Temperatur in °C („Annealing“-Temperatur der Primer); Angabe der Primer-Orientierung: for = forward; rev = reverse. Die verwendeten Primer basieren auf publizierten Sequenzen: IL-2, IL-4 und IL-10 (Siegling A et al., 1994); GAPDH (Kruse JJ et al., 1999); IL-13 (Gillespie KM et al., 1996).*

Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Positiv-Kontrolle („house-keeping“ Gen) verwendet. Die Amplifikate wurden in einem 2%igen Agarosegel (Amresco über MoBiTec GmbH, Göttingen) separiert und anschließend in einem UV-Transilluminator mit Digitalkamera (ImageMaster UDS von Pharmacia Biotech, Freiburg) fotografiert und die relativen Intensitäten der einzelnen Banden mit der Image-Master-Software Version 3.0 (Amersham Pharmacia Biotech) ermittelt. Die in den Diagrammen dargestellten Ergebnisse dieser Analysen repräsentieren das Verhältnis der relativen Expression der interessierenden Gene zur GAPDH-Bandenintensität.

### 3.12. Statistische Aufarbeitung der Ergebnisse

Alle ermittelten Zahlenwerte wurden statistisch aufgearbeitet. Für die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurde das Programm Excel (Fa. Microsoft) verwendet.

---

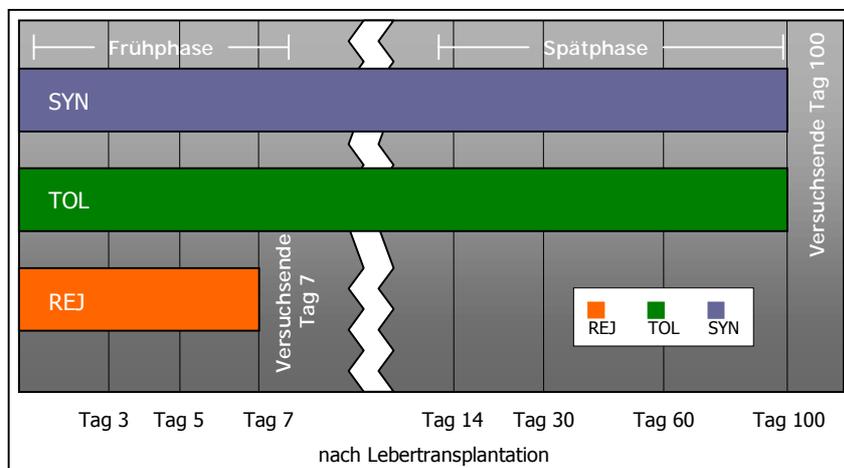
## 4. Ergebnisse

---

Das Ziel dieser Arbeit war, die Mechanismen der Lebertransplantat-Spontantoleranz näher zu charakterisieren. Hierzu wurden die intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten durchflußzytometrisch und molekularbiologisch analysiert.

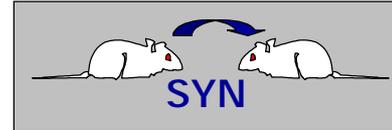
### 4.1. Die Transplantationsgruppen: Immunologische Charakteristika

Die orthotope Lebertransplantation in der Ratte wurde in folgenden Stammkombinationen durchgeführt (Abb. 3.1 und Abb. 4.1): LEW-nach-LEW (Syngene Kontrollgruppe, SYN); DA-nach-LEW (Abstoßungs- bzw. Rejektionsgruppe, REJ); LEW-nach-DA (Spontantoleranzgruppe, TOL). Der Beobachtungszeitraum nach Transplantation betrug für die Abstoßungsgruppe sieben Tage (Frühphase), für die Spontantoleranzgruppe und die Syngene Kontrollgruppe jeweils 100 Tage (Früh- und Spätphase).



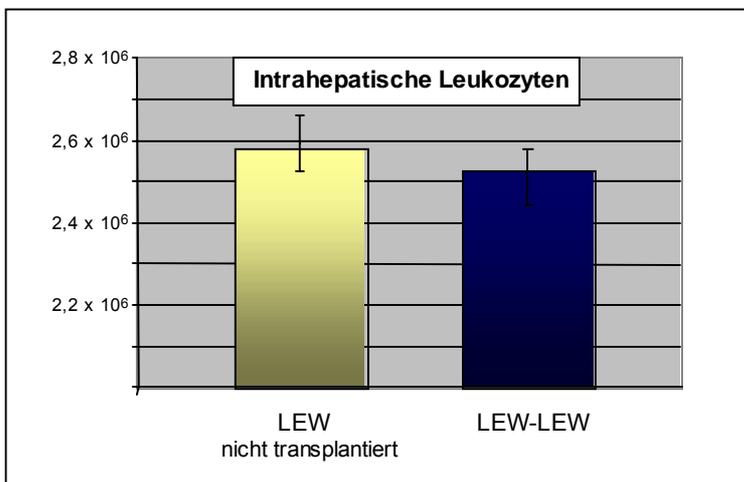
*Abb. 4.1: Übersicht über die Versuchsdauer der einzelnen Experimentalgruppen. Tiere der Syngenen Kontrollgruppe (SYN) und der Spontantoleranzgruppe (TOL) wurden bis zum Versuchsende an Tag 100 nach Transplantation beobachtet. Die Analysezeitpunkte waren jeweils Tag 3, 5, 7, 14, 30, 60 und 100, in der Abstoßungsgruppe (REJ) Tag 3, 5 und 7 p.op.*

#### 4.1.1. Die Syngene Kontrollgruppe (SYN)



Die Bedeutung der Syngenen Kontrollgruppe lag darin, die durch Operation ausgelöste antigenunabhängige Immunantwort, verursacht durch den Ischämie- und Reperfusionsschaden, von der Transplantat-induzierten Immunantwort zu unterscheiden.

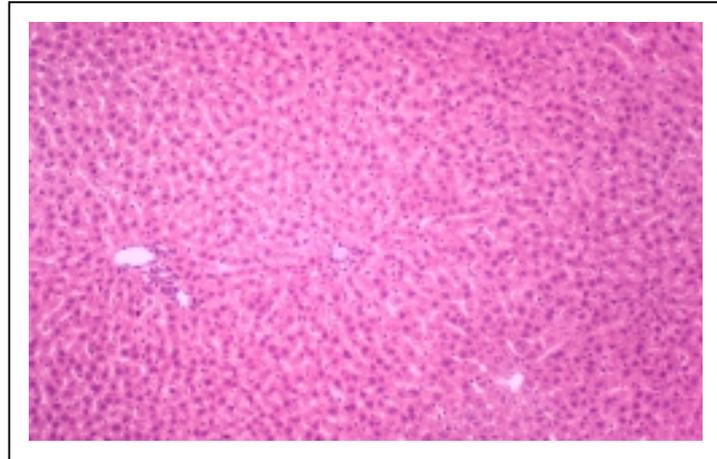
In einem ersten Schritt wurde der Anteil intrahepatischer Leukozyten in syngen transplantierten Lebertransplantaten bestimmt. Der Vergleich mit nicht-transplantierten Lebern zeigte, dass diese Lebertransplantate – wie erwartet – keinen erhöhten Anteil an intrahepatischen Leukozyten aufwiesen:  $2,59 \pm 0,6 \times 10^6$  Leukozyten bei nicht-transplantierten LEW-Tieren versus  $2,52 \pm 0,8 \times 10^6$  Leukozyten in der Syngenen Kontrollgruppe (s. Abb. 4.2). Dies bestätigte auch die histologischen Untersuchungen (s. Abb. 4.3). Syngene Lebertransplantate wiesen weder am Tag drei nach Transplantation (s. Abb. 4.2) noch zu einem späteren Zeitpunkt (s. Abb. 4.9) vermehrt Zellinfiltrate auf.



*Abb. 4.2: Anzahl der isolierten intrahepatischen Leukozyten pro Gramm Leber aus nicht-transplantierten LEW-Tieren und Tieren der Syngenen Kontrollgruppe (LEW – LEW) am dritten post-operativen Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 4 Tieren.*

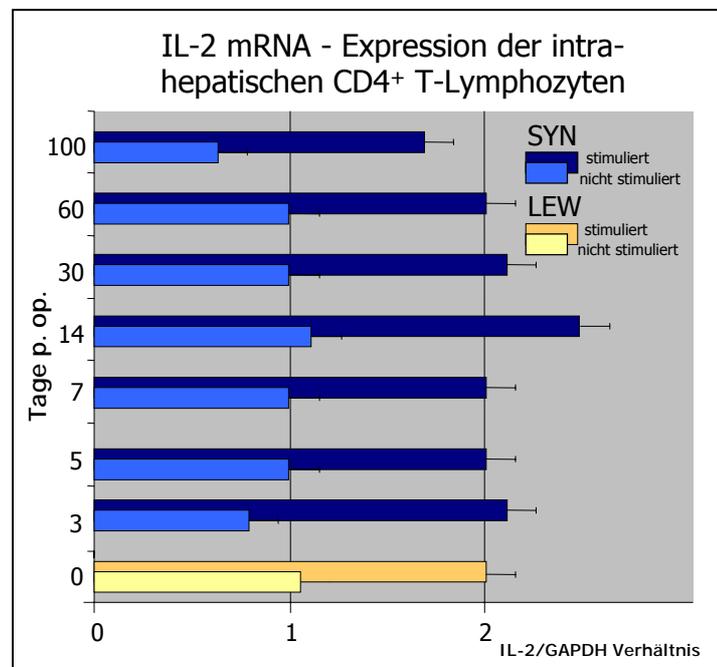
Das histologische Bild syngen transplantierte Lebern unterschied sich nicht von dem nicht-transplantierte Lebern (s. Abb. 4.3).

Abb. 4.3: Repräsentative H&E-Histologie einer Lebertransplantatbiopsie aus der Syngen Kontrollgruppe am dritten postoperativen Tag. Infiltrate mit immunkompetenten Zellen des Empfänger-Immunsystems waren kaum zu finden.



Neben einer ausbleibenden Infiltration zeigten die isolierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Syngen Kontrollgruppe auch keine Zeichen einer Immunaktivierung (s. Abb. 4.4). Erst nach einer *in vitro* Stimulierung (s. Kap. 3.11.1) war ein Anstieg von IL-2 mRNA zu beobachten gewesen.

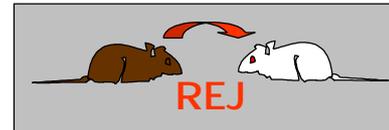
Abb. 4.4: Semiquantitativer Nachweis von IL-2 Amplifikat (RT-PCR) nicht-stimulierter (helle Balken) und stimulierter (dunkle Balken) intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Syngen Kontrollgruppe (SYN) und aus nicht transplantierten Tieren (LEW). Dargestellt ist das Verhältnis von IL-2 zu GAPDH Amplifikat als Mittelwert und Standardabweichung aus drei verschiedenen Zellisolierungen.



---

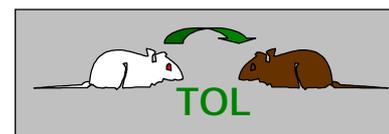
Erwartungsgemäß wurden in syngenem Lebertransplantat somit keine Anzeichen einer Immunaktivierung festgestellt. Dies war wesentliche Voraussetzung, um die immunologischen Vorgänge in den beiden allogenen Gruppen von operationsbedingten Veränderungen zu unterscheiden.

#### 4.1.2. Die Abstoßungsgruppe (REJ)



In vorangegangenen Arbeiten der Gruppe wurde gezeigt, dass LEW-Empfänger von DA-Lebertransplantaten um den 12. Tag nach Transplantation an der akuten und fulminanten Abstoßung versterben (siehe Einleitung). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Versuch am Tag 7 p.op. beendet, um die zellulären und molekularen Mechanismen untersuchen zu können. Die in diesen Lebertransplantaten ablaufenden immunologischen Reaktionen (wie Infiltration mit immunkompetenten Zellen, Zytokinmuster der intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, etc.) werden in späteren Kapiteln zusammen mit den Analysen der Spontantoleranzgruppe beschrieben.

#### 4.1.3. Die Spontantoleranzgruppe (TOL)



Im Gegensatz zur Abstoßungsgruppe (DA-nach-LEW) wurden Lebertransplantate aus LEW-Spendern von DA-Empfängern spontan toleriert. Trotz eines kompletten MHC-Mismatch überlebten alle Tiere dieser Versuchsgruppe ohne Immunsuppression langfristig (> 100 Tage). Während dieses Langzeitüberleben eine Besonderheit des Lebertransplantates war - eigene Daten belegen Überlebenszeiten von mehr als 300 Tagen - wurden andere vaskularisierte Organe von LEW-Spendern, wie Herz oder Niere, von ihren DA-Empfängern akut abgestoßen. Dies zeigte, dass das Immunsystem von DA-Empfängern die Antigene von LEW-Spendern als fremd erkannte und auf die so eingebrachten Antigene reagierte.

---

*Nachweis transplantatspezifischer Toleranz:*

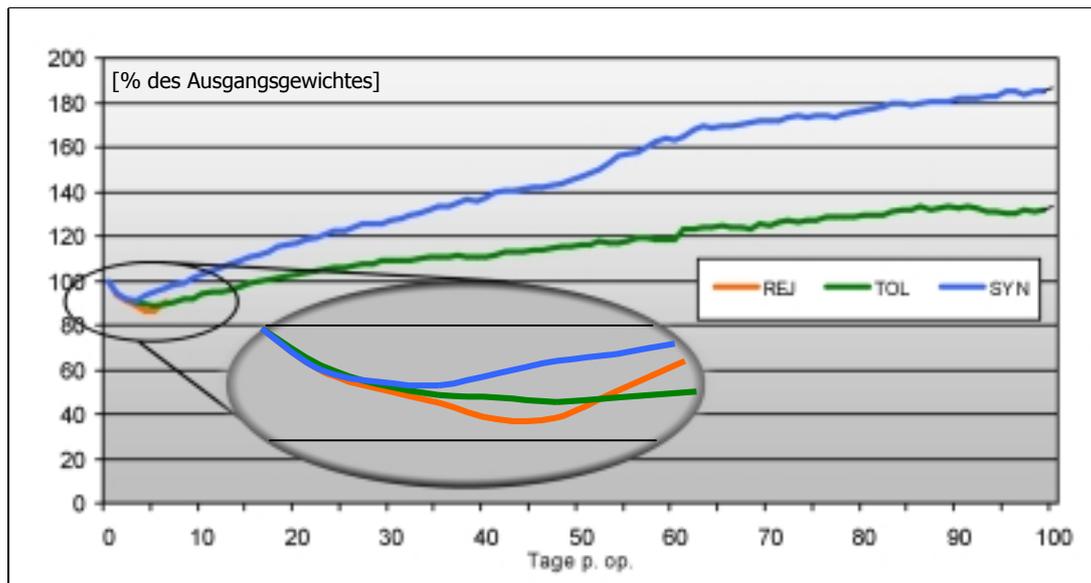
Da ein solches Langzeitüberleben ohne Immunsuppression in der Regel auf Toleranz hinweist, wurde das Immunsystem der DA-Empfängertiere auf charakteristische Merkmale der Toleranz überprüft. Hierzu erhielten langzeitüberlebende DA-Tiere (n=6) am Tag 100 p.op. zusätzlich zu ihrem LEW-Lebertransplantat Herzen in heterotoper Position, entweder von LEW-Spendern oder von sog. Drittstamm-Spendern (hier Brown Norway, BN). Während LEW-Herzen langfristig akzeptiert wurden (>100 Tage), waren die BN-Herzen bereits innerhalb von acht Tagen ohne Funktion (Daten hier nicht gezeigt). Dieser Abstoßungszeitpunkt wurde auch beobachtet, wenn nicht lebertransplantierte DA-Tiere BN-Herzen erhielten. Die selektive Nichtreaktivität der lebertransplantierten DA-Tiere gegenüber Antigenen von LEW, nicht aber gegenüber bisher unbekanntem Antigenen (hier BN), wird als transplantatspezifische Toleranz bezeichnet.

In einer zweiten Serie erhielten DA-Tiere mit spontantolerierten LEW-Lebertransplantaten jeweils ein 1 cm<sup>2</sup> großes Hautareal von BN- und von LEW-Ratten, wobei nur die LEW-Haut ohne Immunsuppression einwuchs (Daten hier nicht gezeigt). Somit bewiesen auch diese Ergebnisse, dass die Lebertransplantat-Langzeitfunktion in DA-Tieren auf Spontantoleranz beruhte.

---

## 4.2. Die Transplantationsgruppen: Klinischer Verlauf

Das Ausgangsgewicht der Versuchstiere lag in allen drei Gruppen zwischen 250 und 300 g. Ihr Allgemeinzustand wurde täglich überprüft und nach mehreren Faktoren beurteilt: Vigilanz, Körperhaltung, Fellbeschaffenheit und Freßverhalten. Perkutane Leberpalpation und der Gewichtsverlauf wurden zur Objektivierung der Transplantatfunktion herangezogen. Besonders in der Abstoßungsgruppe (REJ: DA -> LEW) fanden sich starke Veränderungen bei den oben genannten Merkmalen. Postoperativ zeigten diese Tiere den größten Gewichtsverlust, eine um den dritten Tag p.op. beginnende Vigilanzeinschränkung, sowie eine zunehmend gekrümmte Haltung und struppigeres Fell. Zusätzlich traten ab Tag 5 p.op. bei fast allen Tieren aus dieser Gruppe ein starker Ikterus als klinisches Zeichen einer Organdysfunktion auf. In der Spontantoleranzgruppe (TOL: LEW -> DA) sowie in der Syngenen Kontrollgruppe (SYN: LEW -> LEW) fanden sich keine Einschränkungen der Vigilanz oder gar ein Ikterus. In der Syngenen Kontrollgruppe erholten sich die Tiere postoperativ erwartungsgemäß am schnellsten und erreichten schon um den zwölften postoperativen Tag ihr Ausgangsgewicht, während die Tiere der Spontantoleranzgruppe dies leicht verzögert um Tag 17 p.op. erreichten (s. Abb. 4.5). DA-Tiere der Spontantoleranzgruppe zeigten einen ähnlichen Gewichtsverlauf wie die nicht-transplantierten DA-Tiere (Daten hier nicht gezeigt), sie nahmen – ob transplantiert oder nicht transplantiert – weniger schnell an Gewicht zu, als die in der Syngenen Kontrollgruppe verwendeten LEW-Tiere.



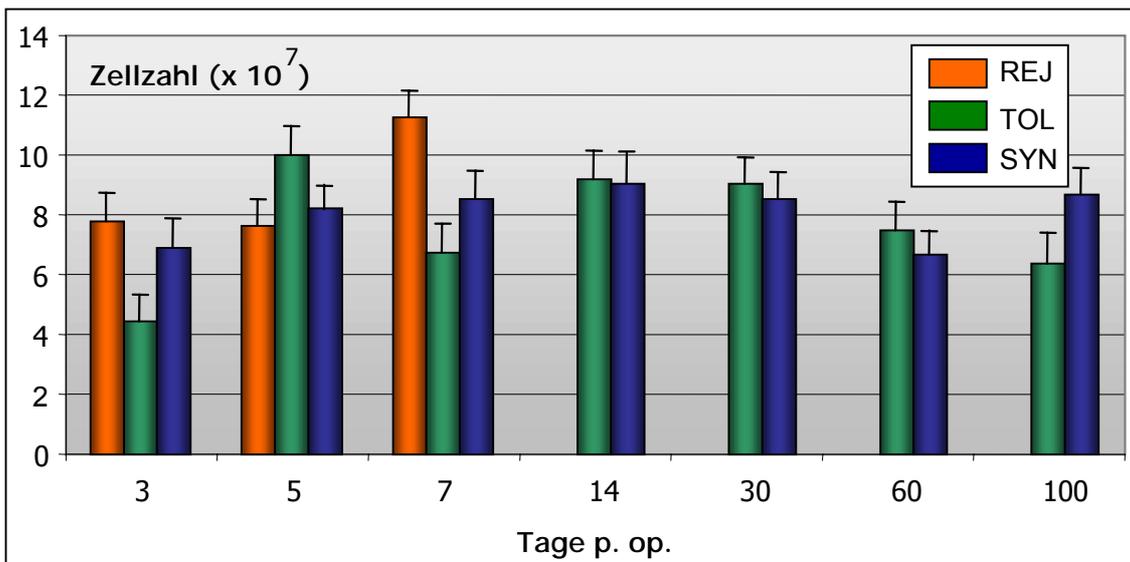
*Abb. 4.5: Postoperativer Gewichtsverlauf aller Versuchstiere der drei Gruppen in Prozent des Ausgangsgewichtes über den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen. Zu jedem Messzeitpunkt wurde das Gewicht von wenigstens drei Tieren pro Gruppe gemittelt. Vergrößert: Die Frühphase nach Transplantation mit dem temporären Gewichtsverlust um Tag 5 p.op. in allen drei Versuchsgruppen.*

### 4.3. Analyse der zellulären Vorgänge bei Abstoßung und Spontantoleranz

Sowohl Abstoßung als auch Toleranz von Lebertransplantaten entwickelten sich aus einer Immunantwort, die sowohl in der Peripherie (z.B. Milz), als auch im Organtransplantat stattfand. Die Immunantwort im Lebertransplantat ging mit einer Infiltration der Transplantate durch immunkompetente Zellen des Empfängers einher. Im folgenden Kapitel 4.3.1 erfolgt ein kurzer Überblick über die Immunaktivierung in der Peripherie (exemplarisch hier in der Milz), während sich der Großteil der Analysen der Immunaktivierung im Lebertransplantat widmete.

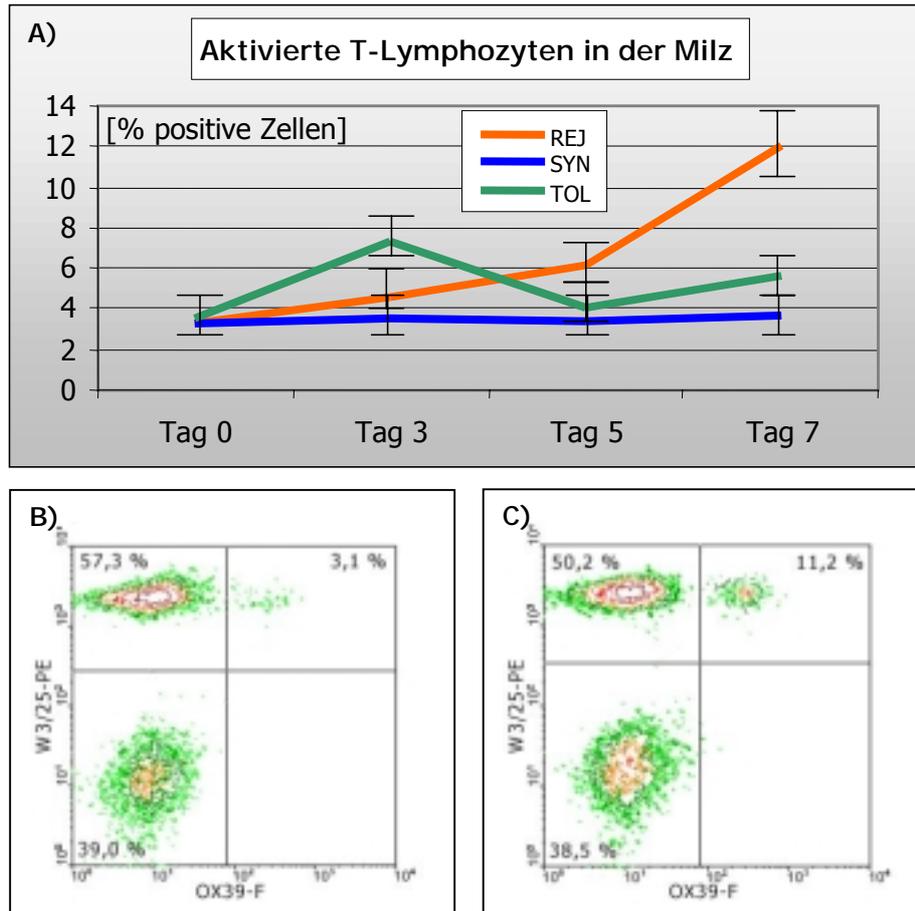
### 4.3.1. Die Immunantwort in der Peripherie

Die Immunantwort nach Lebertransplantation in der Peripherie kommt u.a. dadurch zustande, dass die mit dem Transplantat übertragenen Spenderleukozyten das Transplantat verlassen. In die Milz infiltrierende Spenderleukozyten induzierten in Abhängigkeit von ihrer Anzahl eine unterschiedlich starke Immunaktivierung. Die aktivierten Lymphozyten proliferierten, so dass anhand der aus diesen Milzen isolierten Zellmenge auf den Grad der Immunaktivierung geschlossen werden konnte. Wie Abb. 4.6 zeigt, war die Immunaktivierung in der Abstoßungsgruppe am Tag 7 p. op. signifikant höher als in der Spontantoleranzgruppe.



*Abb. 4.6: Die Anzahl der aus der Milz isolierten Leukozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Lebertransplantation in der Abstoßungsgruppe (REJ), Spontantoleranzgruppe (TOL) und Syngenen Kontrollgruppe (SYN). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 Tieren pro Analysezeitpunkt. Die größte Zellmenge (=stärkste Immunaktivierung) wurde in der Abstoßungsgruppe am Tag 7 p.op. gemessen. Diese Zunahme der Zellzahl ist u.a. auf die Aktivierung von T-Lymphozyten zurückzuführen (s. auch Abb. 4.7).*

Mit der Zunahme der aus der Milz isolierten Zellen stieg auch der Anteil an aktivierten (CD25-positiven) T-Lymphozyten in der Abstoßungsgruppe bis zum Tag 7 p.op. deutlich an (s. Abb. 4.7). In der Spontan toleranzgruppe war dagegen dieser Anstieg wesentlich geringer. Somit war die periphere Immunaktivierung in der Abstoßungsgruppe stärker als in der Spontan toleranzgruppe.

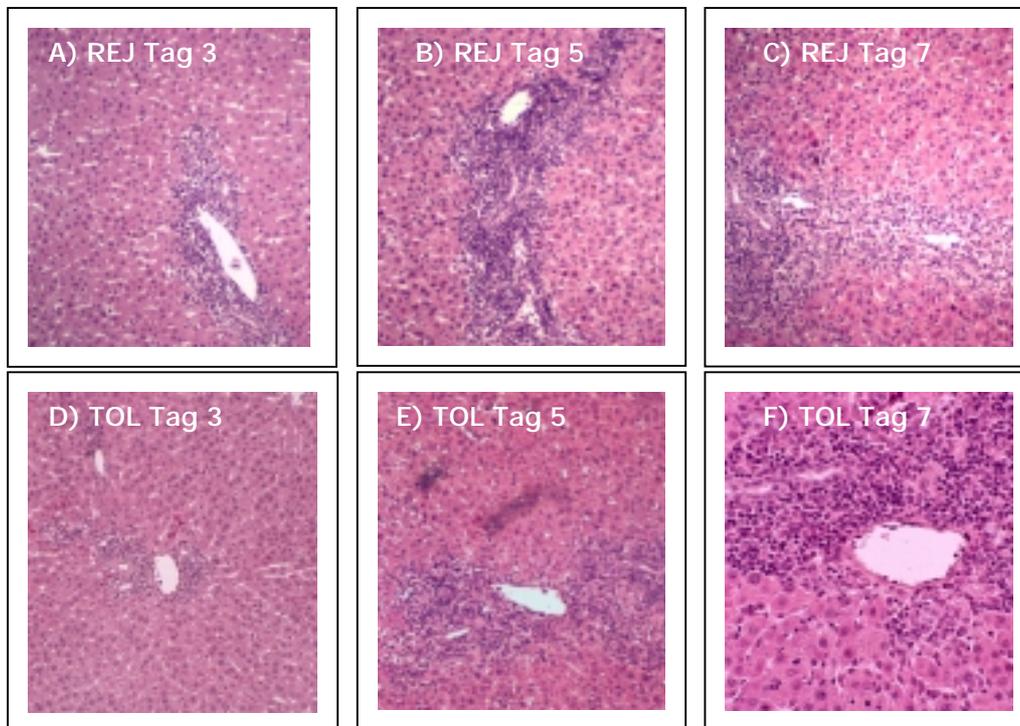


**Abb. 4.7:** A) Der Anteil aktivierter (CD25-positiver) T-Lymphozyten in der Milz während der Frühphase nach Lebertransplantation. Am Tag 7 p.op. war der Anteil CD25-positiver T-Lymphozyten in der Abstoßungsgruppe am Größten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von wenigstens drei Tieren pro Gruppe. B) Exemplarische Dot-Plot Graphik aus der Abstoßungsgruppe am Tag 3 und C) am Tag 7 p.op.; erkennbar ist der deutliche Anstieg CD25-positiver CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten von 3 auf über 10%. Basierend auf den in B und C ermittelten Daten für aktivierte T-Lymphozyten wurde das Diagramm in A erstellt.

---

### 4.3.2. Die Immunantwort im Lebertransplantat: Histologische Auswertung

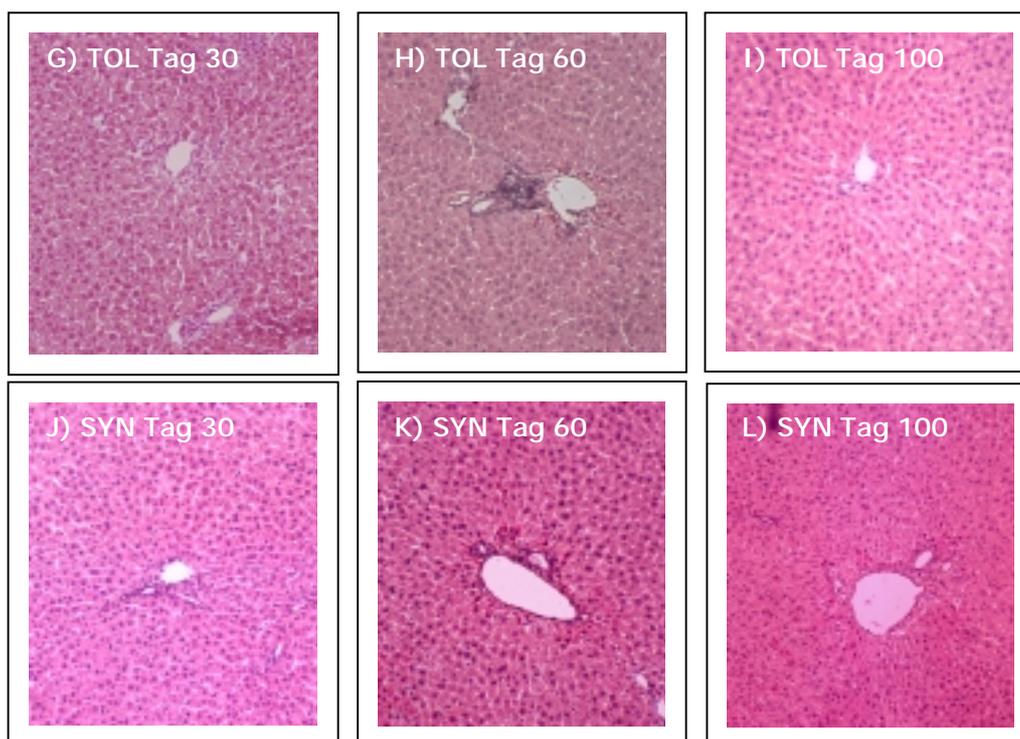
Die Immunantwort im Lebertransplantat beruht im Wesentlichen auf der Einwanderung von Immunzellen des Empfängers. Um die Stärke dieser Immunantwort zu bestimmen, wurden die Lebertransplantate der Abstoßungs- und Spontantoleranzgruppe hinsichtlich der Stärke dieser Infiltration qualitativ (HE-Histologie, s. Abb. 4.8 und Abb. 4.9) und quantitativ (s. Abb. 4.10) untersucht.



*Abb. 4.8: Repräsentative Leberhistologien aus der Frühphase nach Transplantation. Abstoßungsgruppe (REJ): A) Grad I: geringes lymphozytäres Infiltrat am Portalfeld der Leber. B) Grad II: zunehmendes Infiltrat, auch lobulär und einzelne nekrotische Hepatozyten. C) Grad III: ausgeprägte Nekrosen mit periportalem und lobulärem Infiltrat. Spontantoleranzgruppe (TOL): D) Grad I, E) Grad II: periportale und lobuläre Infiltration, F) Grad II: Periportalfeld mit ausgedehntem Infiltrat (HE, x200). Pro Analysezeitpunkt wurden wenigstens drei Tiere pro Gruppe begutachtet.*

---

In der Frühphase nach Transplantation waren für die Abstoßungs- und Spontantoleranzgruppe ab Tag 3 p.op. periportale und ab Tag 7 zusätzlich auch lobuläre Infiltrate mit mononukleären Zellen nachweisbar (s. Abb. 4.8). Dabei waren keine wesentlichen Unterschiede für beide allogenen Gruppen zu erkennen. Für die Spätphase wurde die Infiltration zwischen Spontantoleranzgruppe und Syngener Kontrollgruppe verglichen, da das Versuchsende für die Abstoßungsgruppe bei Tag 7 lag (s. Abb. 4.1). Während Lebertransplantate der Spontantoleranzgruppe (TOL) in der Frühphase stark infiltriert waren (s. Abb. 4.8), näherte sich in der Spätphase das histologische Bild kontinuierlich dem der Syngenen Kontrollgruppe (s. Abb. 4.9). Am Tag 100 p.op. war histologisch kaum ein Unterschied zur Syngenen Kontrollgruppe festzustellen.



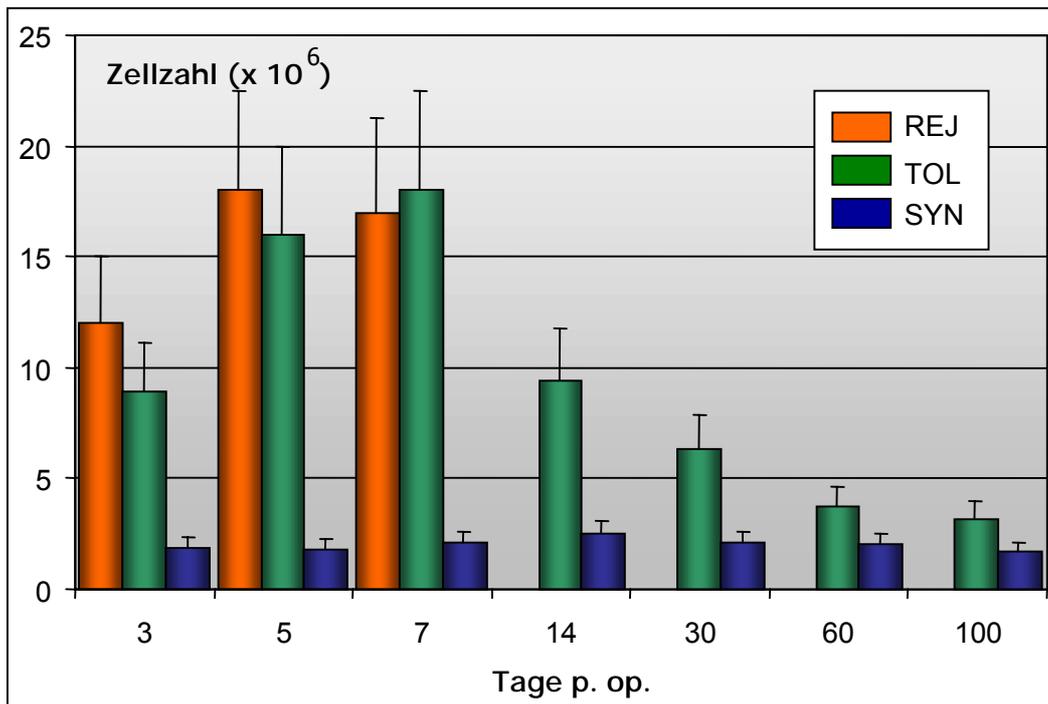
**Abb. 4.9:** Repräsentative Leberhistologien aus der Spätphase nach Transplantation. **Spontantoleranzgruppe (TOL):** G) Grad I: geringes lymphozytäres Restinfiltrat in der Periportalregion. H) weiterhin rückläufiges Infiltrat, I) einzelne verbliebene Lymphozyten, kein Infiltrat mehr nachweisbar. **Syngene Kontrollgruppe (SYN):** J), K), L) keine lymphozytäre Infiltration vorhanden. Pro Analysezeit wurden wenigstens drei Tiere pro Gruppe begutachtet.

---

Die Lebertransplantate der Spontantoleranzgruppe waren somit in der Frühphase stark infiltriert, während sich in der Spätphase dieses Infiltrat kontinuierlich verringerte. Am Tag 100 waren kaum Unterschiede zur Syngeneten Kontrollgruppe nachweisbar.

#### 4.3.3. Die Immunantwort im Lebertransplantat: Quantifizierung und Phänotypisierung

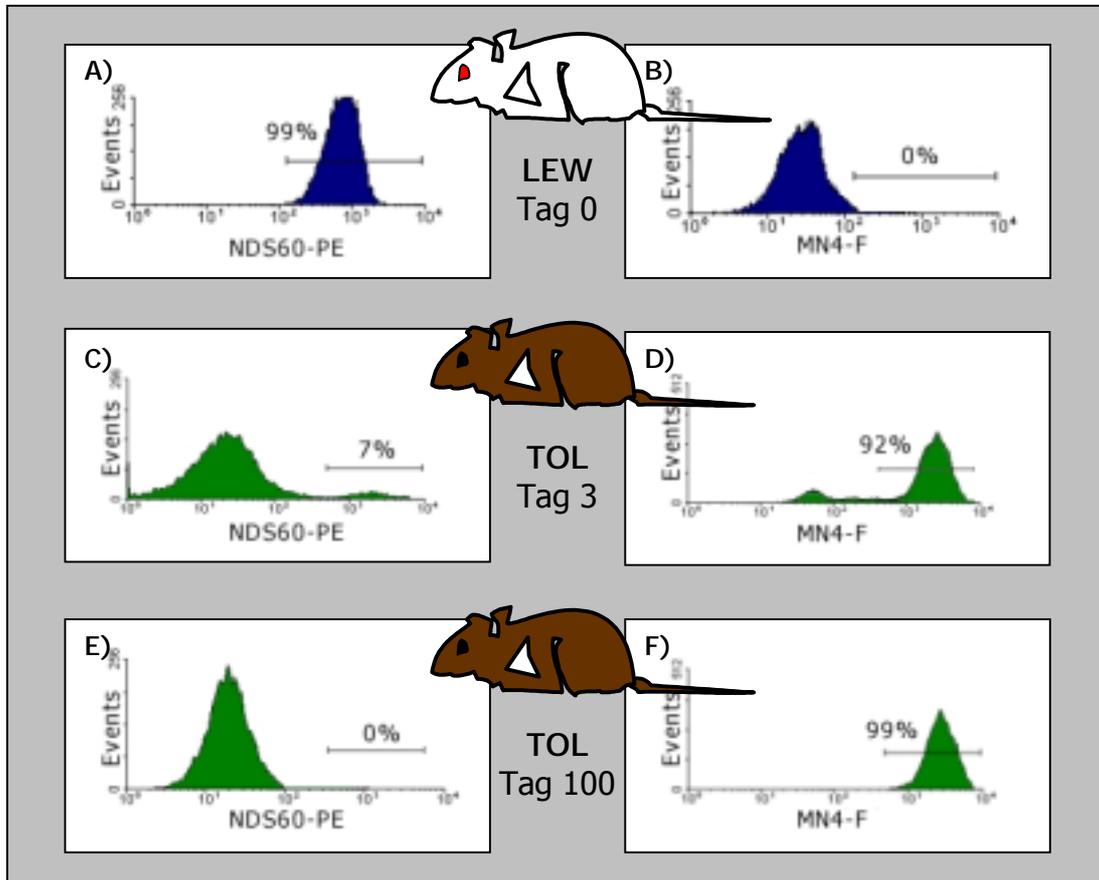
Basierend auf den histologischen Daten aus Kapitel 4.3.2. wurde der Anteil der intrahepatischen Leukozyten quantitativ als Maß der Infiltrationsstärke pro Gramm Lebergewicht bestimmt. Sowohl in der Spontantoleranzgruppe als auch in der Abstoßungsgruppe wurde ein dynamischer Verlauf der Infiltration nachgewiesen (s. Abb. 4.10). Insbesondere bis Tag 7 war der Anteil der isolierten Leukozyten in den Lebertransplantaten beider Gruppen nahezu identisch. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die Infiltration mit  $18 \pm 4,2 \times 10^6$  Zellen pro Gramm Leber ihr Maximum. Im Vergleich dazu blieb in der Syngeneten Kontrollgruppe die Anzahl der intrahepatischen Leukozyten mit  $2,1 \pm 1,3 \times 10^6$  Zellen pro Gramm Leber über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu konstant. In der Spontantoleranzgruppe reduzierte sich die Menge der infiltrierten Leukozyten ab Tag 14 p.op. kontinuierlich bis auf  $3,2 \pm 0,13 \times 10^6$  Zellen pro Gramm Leber am Tag 100 p.op.; dies entsprach somit etwas weniger als das Doppelte der Zellzahl in der Syngeneten Kontrollgruppe ( $1,7 \pm 0,41 \times 10^6$  Zellen pro Gramm Leber).



*Abb. 4.10: Anzahl der aus Lebertransplantaten isolierten Leukozyten (angegeben in Zellen pro Gramm Leber) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation in der Abstoßungsgruppe (REJ), Spontantoleranzgruppe (TOL) und Syngenem Kontrollgruppe (SYN). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von wenigsten drei Tieren pro Gruppe und Meßzeitpunkt. Charakteristisch für die Lebertransplantate der allogenen Gruppen REJ und TOL war, dass sie bis Tag 7 nach Transplantation bis zu 9-mal mehr Leukozyten enthielten als die syngen transplantierten Lebern. Ab Tag 7 p.op. verringerten sich dann die Leukozyten kontinuierlich in den spontantoleranten Lebern.*

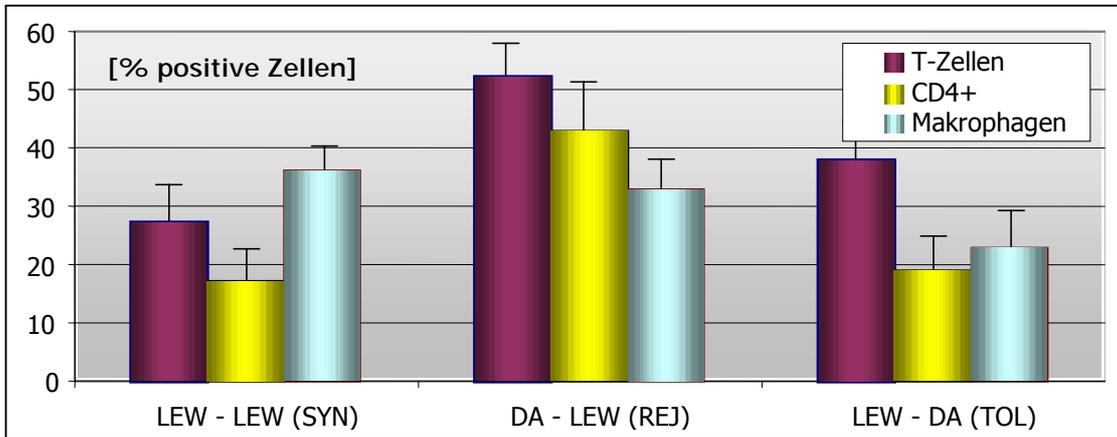
Kurze Zeit nach Transplantation unterschieden sich die Leukozyten in den Lebertransplantaten der Spontantoleranzgruppe sowie der Abstoßungsgruppe hinsichtlich ihres MHC-Haplotyps (s. Abb. 4.11). Ursache hierfür war, dass nach Transplantation die spontantoleranten Lebern von immunkompetenten Zellen des Empfängers (MHC-Haplotyp RT1<sup>avl</sup>) infiltriert wurden. Diese Transplantate enthielten aber auch "eigene" Leukozyten mit dem MHC-Haplotyp RT1<sup>l</sup>. Diese ließen sich mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die entweder nur die lebereigenen oder die infiltrierenden Leukozyten markierten, durchflußzytometrisch nachweisen. In Abb. 4.11 wird am Beispiel der spontantoleranten Lebertransplantate gezeigt, dass sich die lebereigenen

Leukozyten (sie werden vom Antikörper NDS60 erkannt) verringerten und von Leukozyten des Empfängers (sie werden vom Antikörper MN4 erkannt) ersetzt wurden. Dies begann bereits in der Frühphase nach Transplantation.



**Abb. 4.11:** Durchflußzytometrische Analyse intrahepatischer Leukozyten vor (Tag 0) und nach Transplantation (Tag 3 bzw. 100) allogener LEW-Lebern (MHC-Haplotyp  $RT1^l$ ) in DA-Empfänger (MHC-Haplotyp  $RT1^{av}$ ). Nach Transplantation verringerte sich der Anteil der lebereigenen Leukozyten (NDS60-positive  $RT1^l$  Zellen) nicht nur kontinuierlich (C und E), sondern sie wurden auch durch Leukozyten aus dem Empfänger-Immunsystem (MN4-positive  $RT1^{av}$  Zellen) ersetzt (D und F). Während vor Transplantation (A und B) sämtliche intrahepatische Leukozyten den MHC-Haplotyp  $RT1^l$  aufwiesen (NDS60-positiv), stellten sie bereits am Tag 3 nach Transplantation nur noch eine sehr kleine Population dar (7% NDS60-positive Zellen). Der Hauptanteil der intrahepatischen Leukozyten wies nun den MHC-Haplotyp  $RT1^{av}$  auf (92% MN4-positive Zellen). Am Tag 100 nach Transplantation waren dann die spontantoleranten LEW-Lebern vollständig mit diesen MN4-positiven Leukozyten besiedelt (repräsentative Darstellung von drei unterschiedlichen Tieren).

Eine erste durchflußzytometrische Typisierung dieser intrahepatischen Leukozyten ergab, dass T-Lymphozyten den größten Anteil an diesen Infiltraten stellten (s. Abb. 4.12).



*Abb. 4.12: Prozentualer Anteil der das Lebertransplantat infiltrierenden MN4-positiven Zellen (siehe auch Abb. 4.11) am Tag 5 nach Transplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von wenigstens drei Tieren pro Gruppe. Zum Infiltrat gehörten sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen) als auch des erworbenen Immunsystems (T-Lymphozyten).*

Wie die Abb. 4.13 zeigt, veränderte sich der Anteil der beiden T-Zellpopulationen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  dynamisch in der Frühphase nach Transplantation.

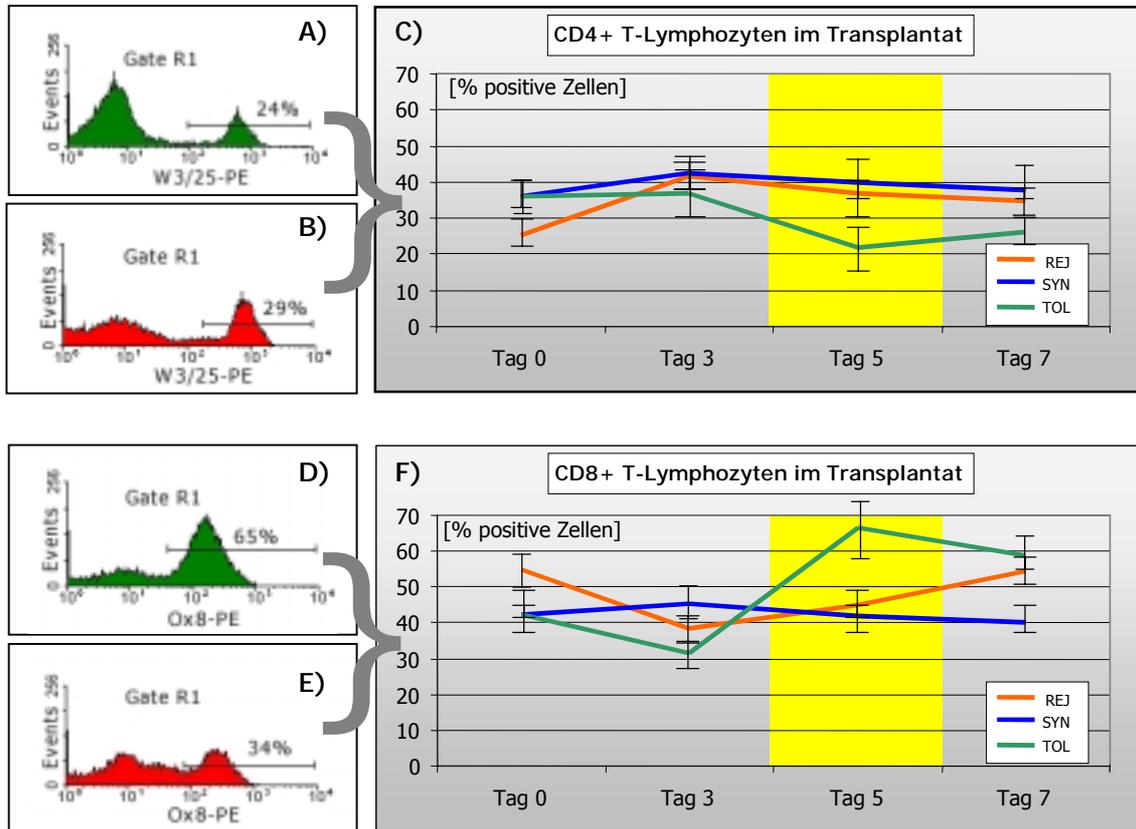
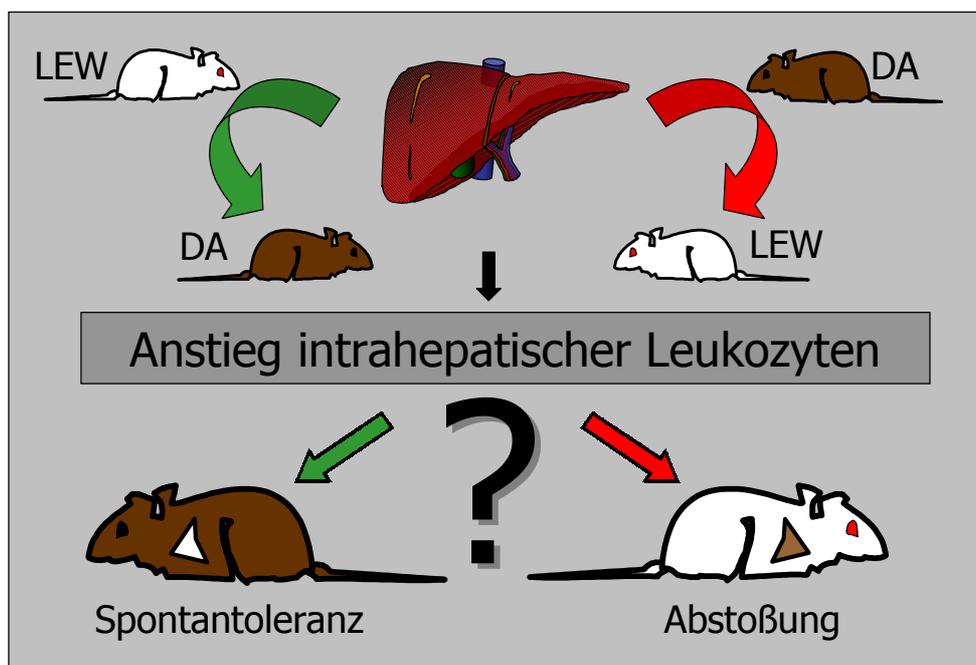


Abb. 4.13: Prozentualer Anteil der  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Lymphozyten in der Frühphase (Tag 0-7 p.op.) nach Lebertransplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von wenigsten drei Tieren pro Gruppe. Die Zahlen hierzu wurden durch Auswertung der entsprechenden Histogramme ermittelt. Histogramme A, B, D und E stellen dabei repräsentative Beispiele aus der Spontantoleranzgruppe und Abstoßungsgruppe für den 5. postoperativen Tag dar. Beide Zellpopulationen veränderten sich dynamisch (C und F).

*Zusammenfassung der zellulären Analysen (Kapitel 4.3.2 und 4.3.3):*

Die Quantifizierung (s. Abb. 4.10) und Phänotypisierung (s. Abb. 4.11) der Leukozyten in den Lebertransplantaten der Spontantoleranzgruppe und Abstoßungsgruppe zeigte, dass es bereits in der Frühphase nach Transplantation zu einer starken Infiltration mit Leukozyten des Empfängers kam. So waren am Tag 3 p.op. in diesen Lebertransplantaten nahezu nur noch Leukozyten der Empfänger nachzuweisen (s. Abb. 4.11 am Beispiel der Spontantoleranzgruppe). Dieses Infiltrat setzte sich aus Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems zusammen (s. Abb. 4.12) und ihr Anteil an der intrahepatischen Population änderte sich dynamisch, wie am Beispiel der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Abb. 4.13 gezeigt.



*Abb. 4.14: Tiere der Spontantoleranzgruppe (LEW-Lebern in DA-Empfängern) und der Abstoßungsgruppe (DA-Lebern in LEW-Empfängern) wiesen in der Frühphase nach Lebertransplantation eine vergleichbare Infiltration der Transplantate mit immunkompetenten Empfängerzellen auf, die entweder zur Lebertransplantat-Spontantoleranz oder zur Abstoßung führten. Im nächsten Arbeitsschritt werden nun diese Infiltrate genauer analysiert. Dabei lag der Schwerpunkt der Analysen auf den intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten.*

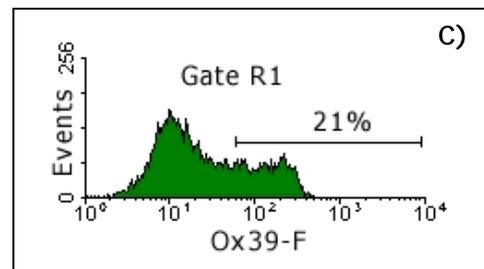
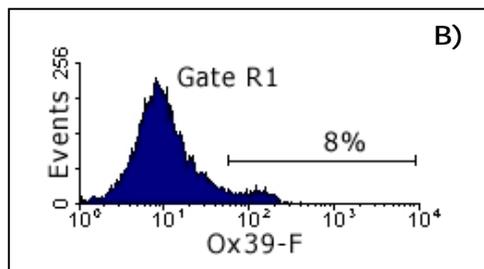
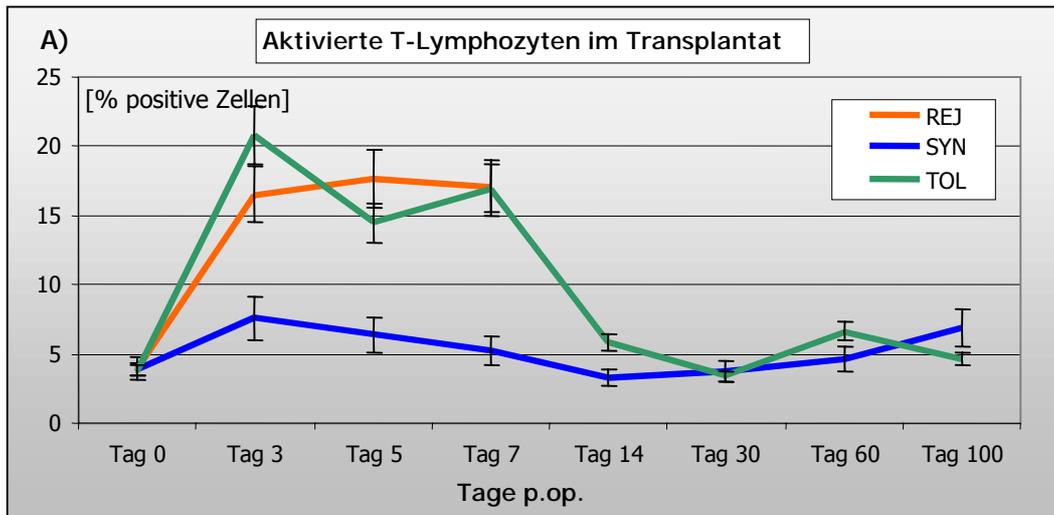
---

## 4.4. Analyse intrahepatischer T-Lymphozyten: Aktivierung

Mit Hilfe des bisher untersuchten Parameters „*Infiltratmenge*“ war es nicht möglich, die Ursache der Spontantoleranz zu klären. Die bisherigen Ergebnisse deuteten aber darauf hin, dass sich Leberspontantoleranz und Abstoßung aus einer Immunaktivierung entwickelten. Da insbesondere T-Lymphozyten an beiden Ereignissen beteiligt waren, wurden diese nun näher analysiert.

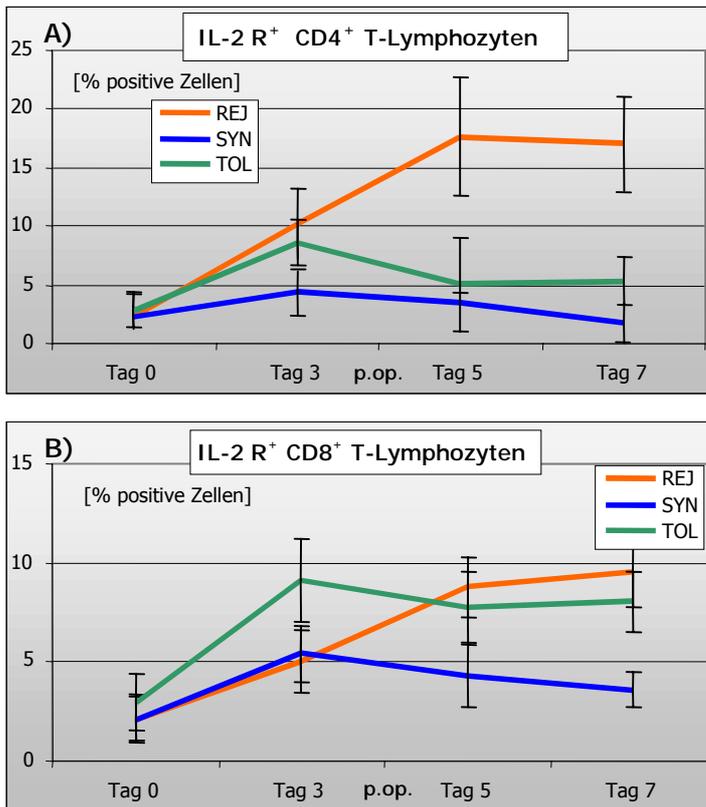
### 4.4.1. Aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Aktivierte T-Lymphozyten exprimieren den Interleukin-2 Rezeptor (IL-2R). Der quantitative Nachweis IL-2R-positiver T-Lymphozyten in den Lebertransplantaten ist somit ein Maß für die Stärke der Aktivierung. Sowohl in der Spontantoleranzgruppe als auch in der Abstoßungsgruppe war bis Tag 7 eine rasche und starke Aktivierung zu beobachten. Wie bereits für die Infiltrationsstärke gezeigt (s. Abb. 4.10), unterschieden sich die beiden Gruppen auch hinsichtlich der Stärke der T-Zellaktivierung nicht wesentlich. Der Anteil an IL-2R-positiven T-Lymphozyten lag zwischen 17 und 21%. In Lebertransplantaten der Spontantoleranzgruppe nahm ab Tag 14 der Anteil aktivierter T-Lymphozyten stark ab. Ein Unterschied zur Syngenen Kontrollgruppe bestand nicht mehr (s. Abb. 4.15).



*Abb. 4.15: Der Anteil aktivierter (IL-2R-positiver) intrahepatischer T-Lymphozyten in der Früh- (Tag 0-7) und Spätphase (Tag 14-100) nach Lebertransplantation (A). Der jeweilige Anteil aktivierter T-Lymphozyten wurde mit dem Antikörper Ox39 durch Auswertung der entsprechenden Histogrammen ermittelt (s. Kap. 3.9). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von wenigsten drei Tieren pro Gruppe. Die Histogramme B und C stellen dabei repräsentative Beispiele aus der Syngenen Kontrollgruppe (B) und Spontantoleranzgruppe (C) für den dritten postoperativen Tag dar.*

Während es keinen wesentlichen Unterschied zwischen der Spontantoleranzgruppe und der Abstoßungsgruppe bezüglich der Menge an aktivierten intrahepatischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gab, enthielten die Lebertransplantate der Abstoßungsgruppe wesentlich mehr aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten als die der Spontantoleranzgruppe (s. Abb. 4.16 A).



**Abb. 4.16:** Aktivierte (Ox39<sup>+</sup>) T-Lymphozyten in der Leber nach Transplantation. A) Der Verlauf aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und B) CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Frühphase nach Transplantation (n=36). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei Tieren pro Gruppe

#### 4.4.2. CD45RC<sup>pos</sup> und CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten

Eine weitere Möglichkeit, um nicht-aktivierte von aktivierten T-Lymphozyten zu unterscheiden, war der Nachweis der CD45RC-Isoform auf der Oberfläche dieser Zellen. Um die Dynamik der T-Zellaktivierung deutlicher darzustellen, wurde das Verhältnis von aktivierten (CD45RC<sup>neg</sup>) zu nicht-aktivierten (CD45RC<sup>pos</sup>) T-Lymphozyten bestimmt. Unmittelbar nach Transplantation stieg dieses Verhältnis für die Spontantoleranzgruppe und Abstoßungsgruppe sehr stark an (s. auch Abb. 4.10 und 4.16).

Interessanterweise verringerte sich dieses Verhältnis nach Tag 5 p.op., wobei diese Abnahme an aktivierten intrahepatischen T-Lymphozyten in der Abstoßungsgruppe stärker war als in der Spontantoleranzgruppe. Hier wurde nach Tag 14 p.op. auch ein erneuter Anstieg des  $CD45RC^{neg}/CD45RC^{pos}$  Quotienten nachgewiesen, der sich von Tag 30 p.op. an wieder reduzierte (s. Abb. 4.17). Am Tag 100 p.op. war kein Unterschied zur Syngenem Kontrollgruppe mehr zu sehen.

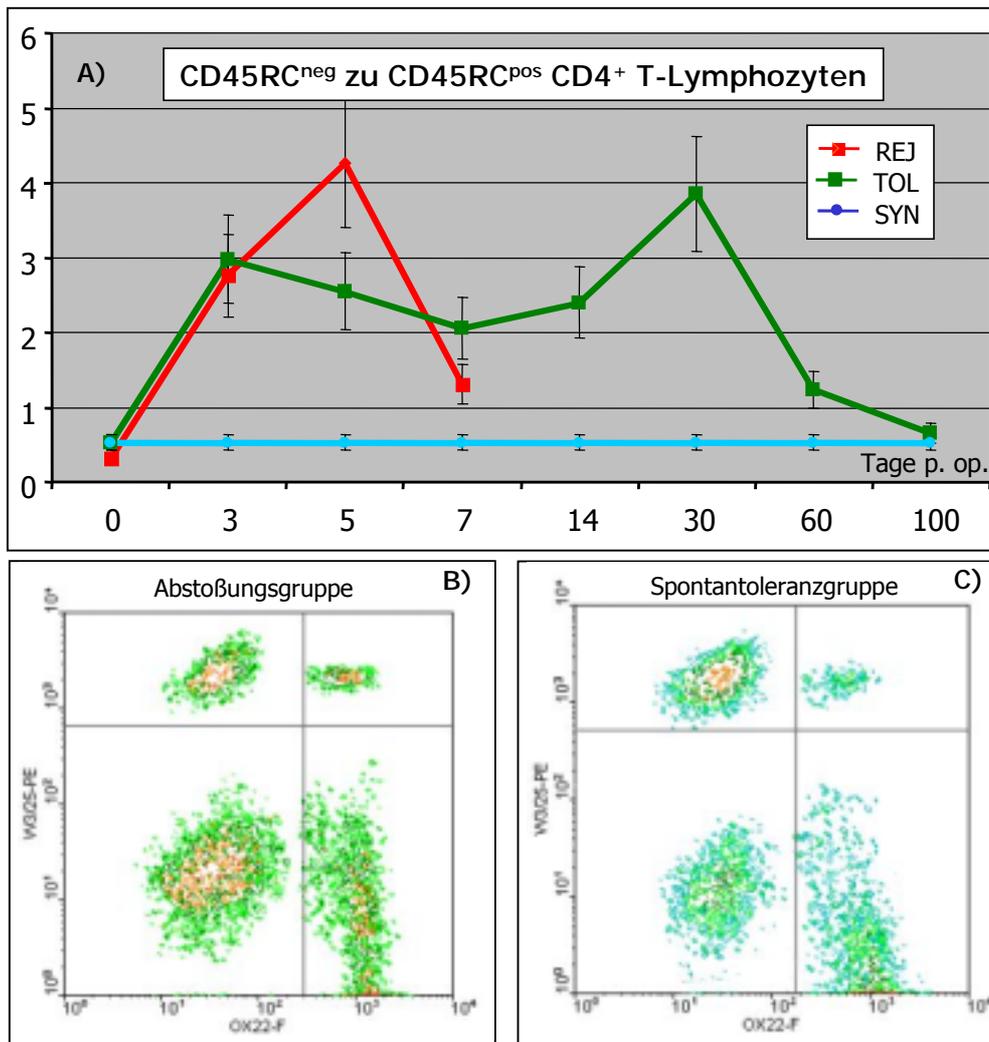


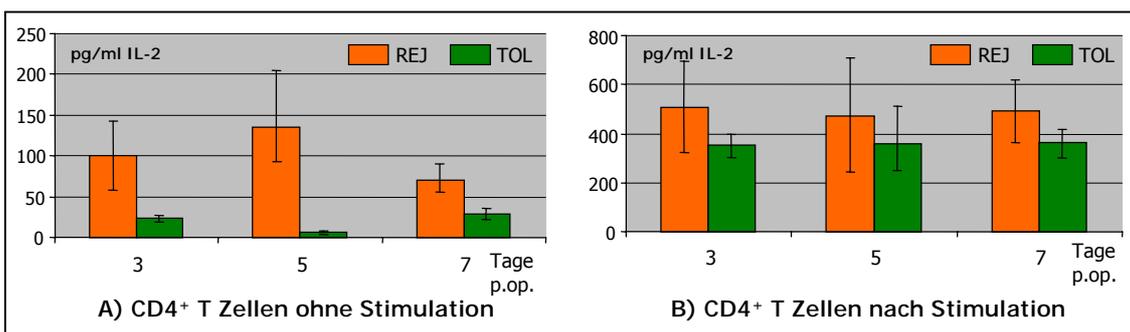
Abb. 4.17: Durchflußzytometrische Phänotypisierung von intrahepatischen  $CD4^+$  T-Lymphozyten mit den Antikörpern W3/25 ( $CD4^+$  T-Lymphozyten) und OX-22 ( $CD45RC$ ). A) Das Verhältnis von  $CD45RC^{neg}$  zu  $CD45RC^{pos}$   $CD4^+$  T-Lymphozyten der drei Versuchsgruppen im Verlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von wenigsten drei Tieren pro Gruppe. Repräsentative Contour-Plot-Diagramme vom 5. postoperativen Tag aus B) der Abstoßungsgruppe und C) aus der Spontantoleranzgruppe.

## 4.5. Analyse intrahepatischer T-Lymphozyten: CD4<sup>+</sup> Zellen

Literaturdaten zeigen, dass sich CD45RC<sup>neg</sup> und CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten in ihrem Zytokinmuster deutlich unterscheiden. Der im vorangegangenen Kapitel beschriebene dynamische Wechsel von aktivierten zu nicht-aktivierten T-Lymphozyten könnte somit auch auf ein verändertes Zytokinprofil hinweisen. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene Zytokine mit Hilfe spezifischer ELISA bestimmt. Diese Daten wurden durch RT-PCR Analysen ergänzt. Das Zytokinprofil aufgereinigter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurde vor und nach Aktivierung bestimmt (s. Kap. 3.11).

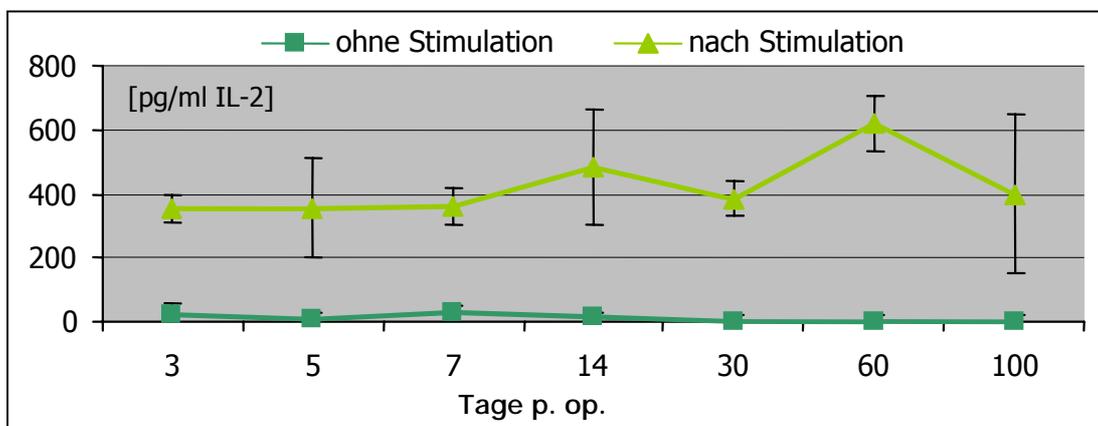
### 4.5.1. Zytokinmuster intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten: ELISA

Frisch isolierte intrahepatische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Spontantoleranzgruppe, die nicht *in vitro* stimuliert wurden, produzierten erheblich weniger Interleukin-2 als die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Abstoßungsgruppe (s. Abb. 4.18 A). So produzierten sie am Tag 5 p.op. zwanzigmal weniger IL-2 als die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Abstoßungsgruppe. Im Gegensatz dazu unterschieden sich diese Zellen nach ihrer Aktivierung (s. Kap. 3.11.1) nicht wesentlich in der Produktion von IL-2 (s. Abb. 4.18 B).



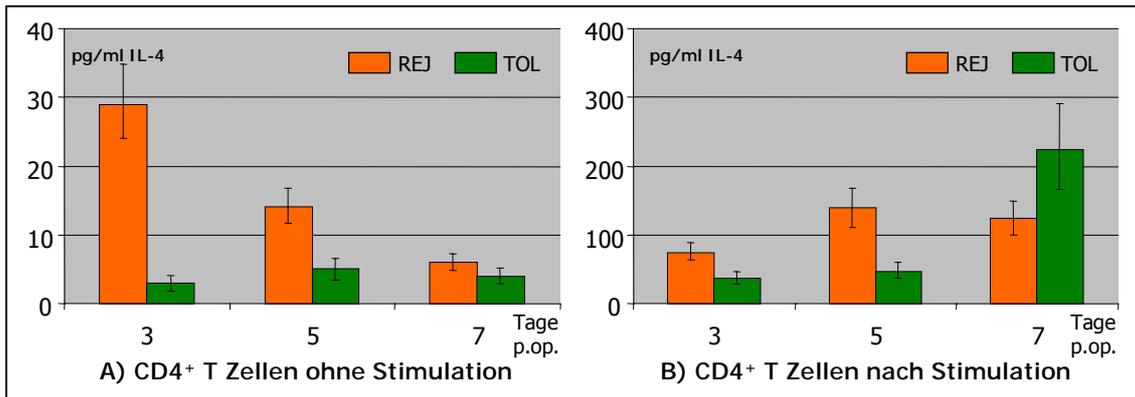
**Abb. 4.18:** Sezernierung von Interleukin-2 (IL-2) durch aufgereinigte intrahepatische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Frühphase nach Lebertransplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Zellisolierungen (jeweils in Zweifachbestimmung im ELISA durchgeführt). Zur Stimulierung wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Platte für 3 Stunden inkubiert (s. Kap. 3.11.1). Abstoßungsgruppe (REJ), Spontantoleranzgruppe (TOL) und Syngene Kontrollgruppe (SYN).

Hier zeigte sich ein Unterschied zwischen den intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Spontantoleranzgruppe und der Abstoßungsgruppe: diese schienen in der Phase der Toleranz weniger stark aktiviert zu sein. Als Ursache für das Entstehen von Spontantoleranz konnte so zumindest ausgeschlossen werden, dass diese Zellen generell nicht mehr stimulierbar waren (s. Abb. 4.18 B). Diese grundsätzliche Aktivierbarkeit der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten spontantoleranter Lebertransplantate blieb auch in der Spätphase nach Transplantation erhalten (s. Abb. 4.19). Die Entwicklung von Spontantoleranz beruhte somit nicht auf einer Immunhemmung auf T-Zell-Ebene.



**Abb. 4.19:** Sezernierung von Interleukin-2 (IL-2) durch aufgereinigte intrahepatische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Spontantoleranzgruppe im postoperativen Verlauf ohne und nach *in vitro* Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Zellisolierungen (jeweils in Zweifachbestimmung im ELISA durchgeführt). Zur Stimulierung siehe Kap. 3.11.1. Die Aktivierbarkeit der isolierten Zellen blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum bis Tag 100 nach Transplantation erhalten.

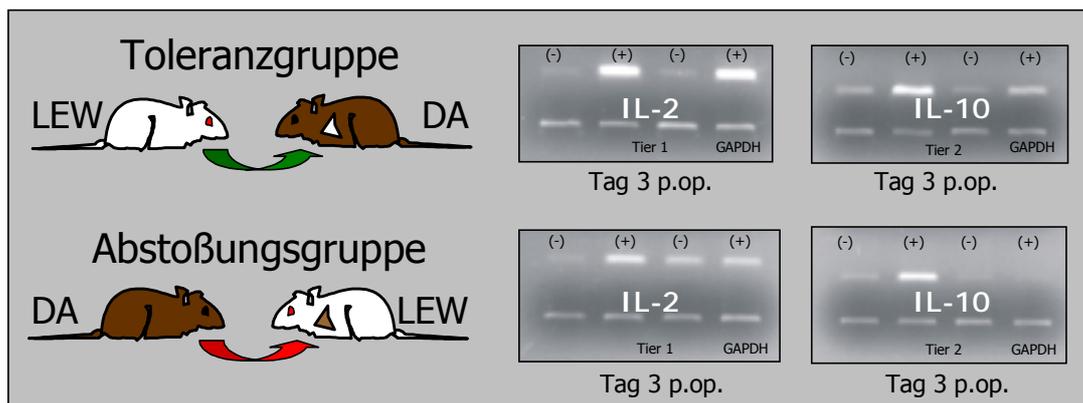
In der Abstoßungsgruppe produzierten die isolierten intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten neben IL-2 auch IL-4 in der Frühphase nach Lebertransplantation (s. Abb. 4.20). Die Menge an messbarem IL-4 im Überstand ohne Stimulierung (s. Abb. 4.20 A) war in der Abstoßungsgruppe sogar größer als in der Spontantoleranzgruppe. Nach ihrer *in vitro* Stimulierung produzierten die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Spontantoleranzgruppe an Tag 7 p.op. deutlich mehr IL-4 als die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Abstoßungsgruppe (s. Abb. 4.20 B).



**Abb. 4.20:** Sezernierung von Interleukin-4 (IL-4) durch aufgereinigte intrahepatische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Frühphase nach Lebertransplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Zellisolierungen (jeweils in Zweifachbestimmung im ELISA durchgeführt). Zur Stimulierung wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Platte für 3 Stunden inkubiert (s. Kap. 3.11.1). Abstoßungsgruppe (REJ), Spontantoleranzgruppe (TOL).

#### 4.5.2. Zytokinmuster intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten: RT-PCR

Zur Ergänzung der ELISA-Daten wurde auch der Anteil an spezifischer mRNA von IL-2, IL-4, IL-10 und IL-13 mit Hilfe der RT-PCR bestimmt. Hierzu wurden jeweils  $6 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten eingesetzt (s. Kap. 3.11.3).



**Abb. 4.21:** Nachweis spezifischer Amplifikate von IL-2 und IL-10 (RT-PCR) nach Auftrennung in einem 2%-igen Agarose-Gel. Die Zytokinexpression wurde vor (-) und nach (+) in vitro Stimulierung gemessen. Dabei wurde GAPDH als „housekeeping“-Gen verwendet. Gezeigt sind repräsentative Daten von jeweils zwei transplantierten Tieren.

Für die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Spontantoleranzgruppe und der Abstoßungsgruppe war IL-2 mRNA in der Frühphase nach Transplantation nachzuweisen (s. Abb. 4.22). Wie bereits die ELISA-Daten zeigten, waren die isolierten Zellen aus beiden allogenen Gruppen aktiviert und sie ließen sich restimulieren.

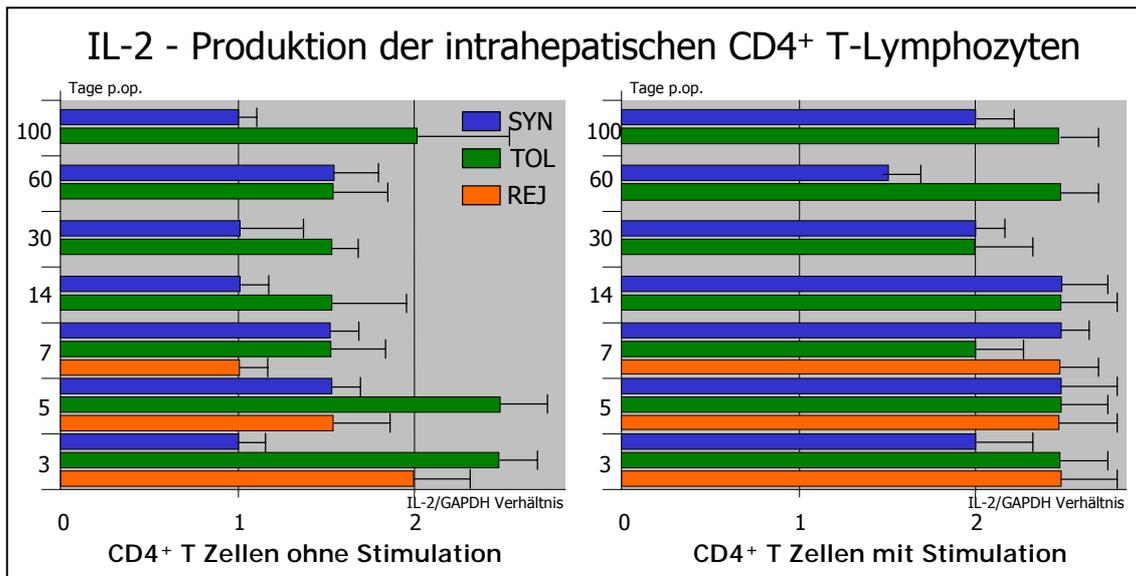
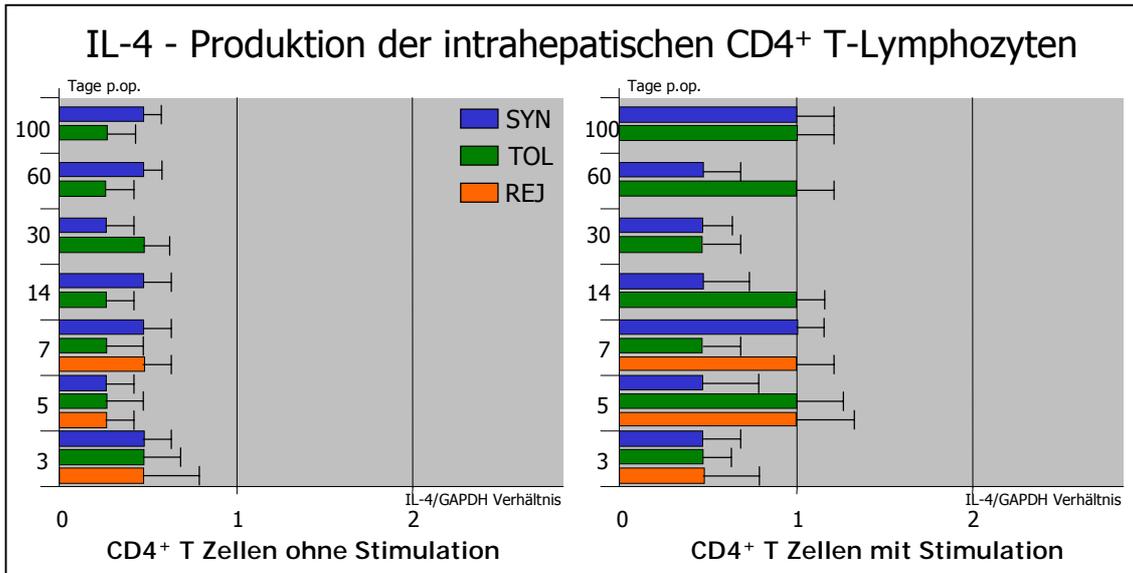
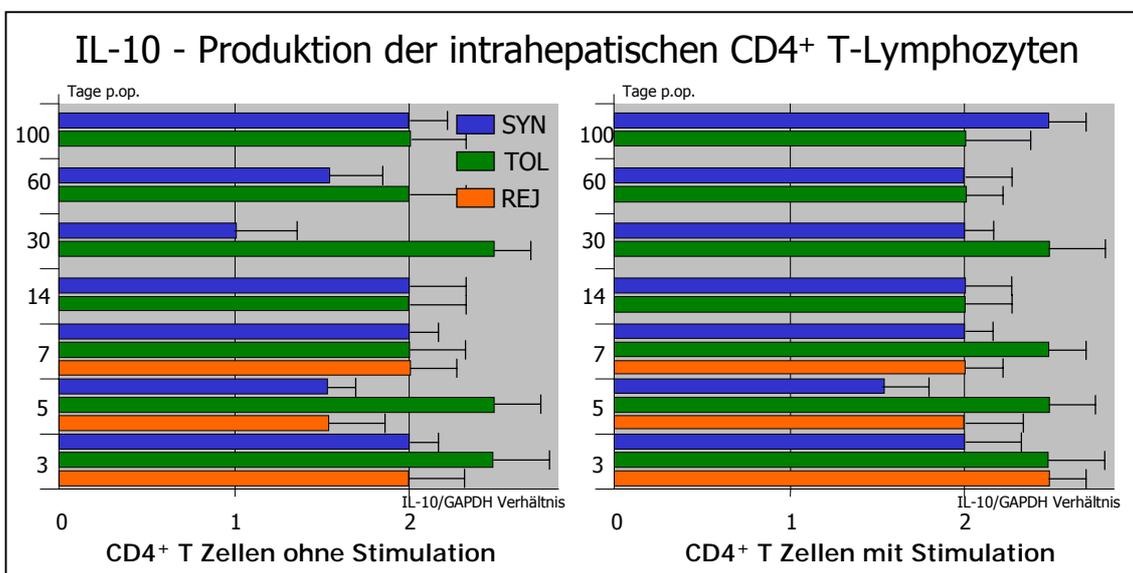


Abb. 4.22: Semiquantitativer Nachweis von IL-2 Amplifikat nicht-stimulierter und stimulierter intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (RT-PCR). Dargestellt ist das Verhältnis von IL-2 zu GAPDH Amplifikat als Mittelwert und Standardabweichung von drei Zellisolierungen (jeweils drei PCR-Wiederholungen) aus Tieren der Abstoßungsgruppe (REJ), Spontantoleranzgruppe (TOL) und Syngenen Kontrollgruppe (SYN).

Die Expressionsanalyse für die mRNA der beiden Zytokine IL-4 und IL-10 zeigte keine Unterschiede zwischen der Spontantoleranz- und der Abstoßungsgruppe in der Frühphase (s. Abb. 4.23). Überraschenderweise wurde IL-10 mRNA auf hohem Niveau in den intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aller Gruppen vorgefunden, unabhängig davon, ob diese Zellen stimuliert wurden oder nicht (s. Abb. 4.24).

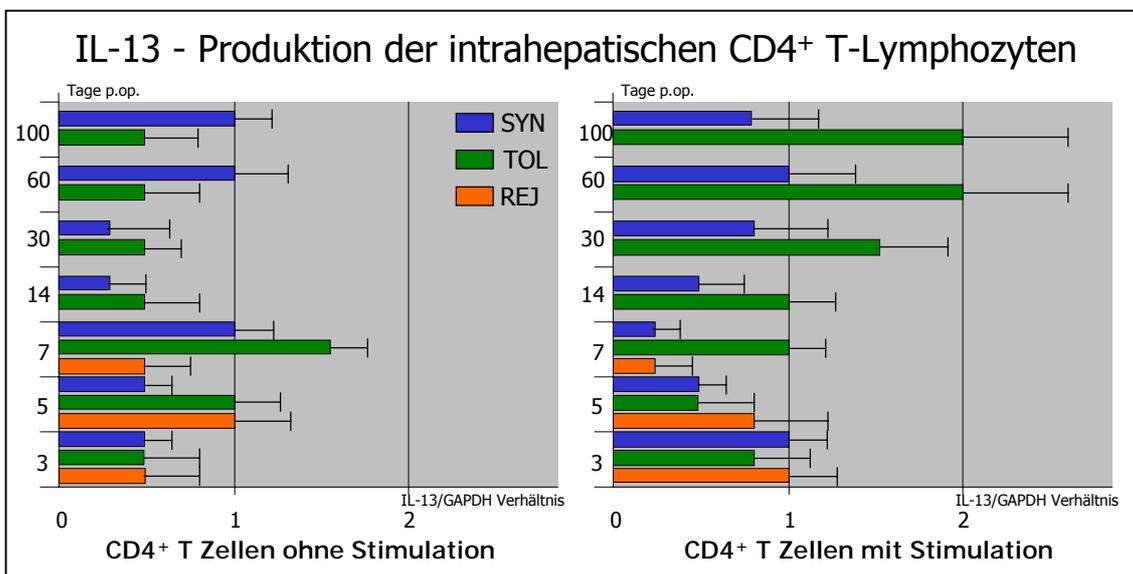


**Abb. 4.23:** Semiquantitativer Nachweis von IL-4 Amplifikat (RT-PCR) nicht-stimulierter und stimulierter intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach Transplantation. Dargestellt ist das Verhältnis von IL-4 zu GAPDH Amplifikat als Mittelwert und Standardabweichung von drei Zellisolierungen (jeweils drei PCR-Wiederholungen) aus Tieren der Abstoßungsgruppe (REJ), Spontantoleranzgruppe (TOL) und Syngenem Kontrollgruppe (SYN).

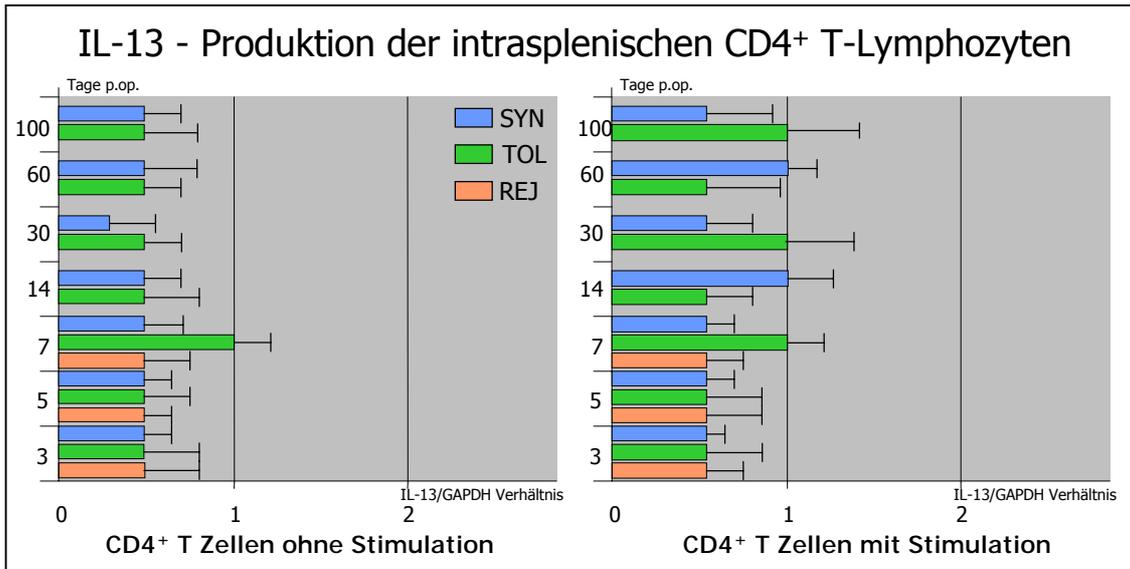


**Abb. 4.24:** Semiquantitativer Nachweis von IL-10 Amplifikat (RT-PCR) nicht-stimulierter und stimulierter intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Dargestellt ist das Verhältnis von IL-10 zu GAPDH Amplifikat als Mittelwert und Standardabweichung von drei Zellisolierungen (jeweils drei PCR-Wiederholungen) aus Tieren der Abstoßungsgruppe (REJ), Spontantoleranzgruppe (TOL) und Syngenem Kontrollgruppe (SYN).

Bei einem weiteren Th2-Zytokin, dem Interleukin-13, das viele Funktionen mit IL-10 teilt, fanden sich hingegen deutliche Unterschiede in der Spätphase bei den einzelnen Transplantationsgruppen (s. Abb. 4.25). So wurde in den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Spontaneranzgruppe ab Tag 30 p.op. eine erhöhte IL-13 mRNA-Expression nachgewiesen, wenn diese *in vitro* stimuliert wurden. Für die intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Syngenen Kontrollgruppe sowie für die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Milz wurde diese Eigenschaft nicht gefunden (s. Abb. 4.26).



**Abb. 4.25:** Semiquantitativer Nachweis von IL-13 Amplifikat (RT-PCR) nicht-stimulierter und stimulierter intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Dargestellt ist das Verhältnis von IL-13 zu GAPDH Amplifikat als Mittelwert und Standardabweichung von drei Zellisolierungen (jeweils drei PCR-Wiederholungen). Für die T-Lymphozyten aus spontaneranzerten Lebertransplantaten wurde ab Tag 30 p.op. eindeutig mehr IL-13 mRNA nach der *in vitro* Stimulierung nachgewiesen. Abstoßungsgruppe (REJ), Spontaneranzgruppe (TOL) und Syngene Kontrollgruppe (SYN).



**Abb. 4.26:** Semiquantitativer Nachweis von IL-13 Amplifikat nicht-stimulierter und stimulierter intrasplenischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Dargestellt ist das Verhältnis von IL-13 zu GAPDH Amplifikat als Mittelwert und Standardabweichung von drei Zellisolierungen (jeweils drei PCR-Wiederholungen) aus Tieren der Abstoßungsgruppe (REJ), Spontantoleranzgruppe (TOL) und Syngenen Kontrollgruppe (SYN).

#### Zusammenfassung der Kapitel 4.4 und 4.5.

Wie in Abb. 4.17 dargestellt, änderte sich das Verhältnis von CD45RC<sup>neg</sup> zu CD45RC<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Spontantoleranzgruppe zwischen Tag 3 und 5 sowie zwischen Tag 14 und 30 p.op. Ab Tag 30 p.op. verringerte sich das Verhältnis zu Gunsten der CD45RC<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. T-Lymphozyten beider allogenen Gruppen sezernierten IL-2, sowohl auf Proteinebene im ELISA (s. Abb. 4.18), als auch auf mRNA-Ebene in der RT-PCR (s. Abb. 4.22). In der Spätphase nach Transplantation waren intrahepatische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lage, nach einer *in vitro* – Stimulierung, IL-13 mRNA zu produzieren (s. Abb. 4.25). Dies war eine Besonderheit der aus den spontantoleranten Lebertransplantaten isolierten Zellen, da die zum gleichen Zeitpunkt aus der Milz dieser Tiere isolierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sowie die intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus Tieren der Syngenen Kontrollgruppe diese Eigenschaft nicht zeigten (s. Abb. 4.26).

---

## 5. Beantwortung der Fragen

---

1) *Dominieren bei Lebertransplantat-Spontantoleranz Th2-Zytokine und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt nach Transplantation? Und finden sich in der Phase der Abstoßung überwiegend Th1-Zytokine und ab welchem Zeitpunkt?*

Die intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Abstoßungs- und Spontantoleranzgruppe sezernierten in der Frühphase (bis Tag 7 nach Lebertransplantation) Zytokine vom „Typ“ Th1 (IL-2) und Th2 (IL-4 und IL-10). Dabei produzierten die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus spontantolerierten Lebertransplantaten weniger IL-2 als die T-Lymphozyten der Abstoßungsgruppe. Die *in vitro* Stimulierung verstärkte diesen Effekt. Die hier untersuchten Zytokine waren sowohl während der Phase der Abstoßung als auch der Spontantoleranz von Lebertransplantaten nachweisbar.

2) *Sind CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten während Abstoßung und Spontantoleranz CD45RC<sup>pos</sup> oder CD45RC<sup>neg</sup>?*

In der Frühphase nach Transplantation exprimierten die intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten beider allogenen Gruppen sowohl die hochmolekulare Isoform (CD45RC<sup>pos</sup>; charakteristisch für naive und Gedächtniszellen) als auch die niedermolekulare Isoform (CD45RC<sup>neg</sup>; charakteristisch für aktivierte Zellen) von CD45RC. Im Verhältnis beider Zelltypen zueinander unterschieden sich beide Gruppen nicht wesentlich. Auch war für beide Gruppen ein frühes Abfallen dieses Verhältnisses zwischen Tag 5 und 7 zu beobachten gewesen, d.h. der Anteil an aktivierten T-Lymphozyten verringerte sich stark.

---

In der Spontantoleranzgruppe stieg ihr Anteil bis Tag 30 erneut an. Somit wurde für spontantolerierte Lebertransplantate ein biphasischer Verlauf aktivierter (CD45RC<sup>neg</sup>) intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten gezeigt. Dieser verringerte sich anschließend kontinuierlich. Bei den in der Spätphase nach Transplantation isolierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten dominierte der CD45RC<sup>pos</sup> Phänotyp (>60%).

*3) Ist die kombinierte Analyse von Zytokinen und Oberflächenmolekülen aussagekräftig genug, um eine T-Zellpopulation zu identifizieren, die möglicherweise für Abstoßung oder Toleranz entscheidend ist?*

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten T-Zell-Analysen belegen, dass in Lebertransplantaten der Abstoßungs- und Spontantoleranzgruppe eine vergleichbar starke Immunantwort induziert wurde. In beiden Gruppen sind die T-Lymphozyten in der Frühphase aktiviert (CD45RC<sup>neg</sup>, IL-2<sup>pos</sup>), wobei sich ihr Anteil zwischen Tag 5 und 7 verringerte (CD45RC<sup>neg</sup>/CD45RC<sup>pos</sup> ≤ 1). In der Spätphase nach Transplantation sind die intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Spontantoleranzgruppe in der Lage, nach *in vitro* Stimulierung vermehrt das Th2-Zytokin IL-13 zu produzieren. Dies konnte bis zum Versuchsende an Tag 100 verfolgt werden. Weder die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die zum gleichen Zeitpunkt aus der Milz dieser Tiere isoliert wurden, noch die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus syngen transplantierten Lebern zeigten diese Eigenschaft. Diese Fähigkeit geht einher mit einem geringeren Anteil an aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (CD45RC<sup>neg</sup>/CD45RC<sup>pos</sup> ≤ 1). Da auch Gedächtniszellen CD45RC<sup>pos</sup> sein können (s. Abb. 1.3), wäre es nahe liegend, dass es sich hierbei um solche Zellen handelt.

---

## 6. Diskussion

---

Spontantoleranz ist ein lang bekanntes Phänomen in der experimentellen Lebertransplantation (Cantor HM, Dumont AE, 1967; Calne RY et al., 1969; Kamada N et al., 1981). Bis heute sind die zellulären und molekularen Grundlagen zwar nicht vollständig geklärt, doch gilt es als sicher, dass die vom Lebertransplantat ausgelöste Immunantwort auch vom Transplantat selbst moduliert wird (Knolle PA, Gerken G, 2000; Wick MJ et al., 2002). Unklar ist jedoch, welche der zahlreichen immunmodulierenden Mechanismen der Leber für die Ausbildung von Toleranz letztlich von Bedeutung sind (Bishop GA et al., 2002). So ist zu der möglichen Beteiligung von T-Lymphozyten mit Regulatorfunktion an der Lebertransplantat-Spontantoleranz zurzeit wenig bekannt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit u.a. das Zytokinprofil intrahepatischer T-Lymphozyten aus der Abstoßungs- und Spontantoleranzgruppe analysiert. Diese Vorgehensweise basiert auf der Vorstellung, dass T-Lymphozyten mit regulatorischer Funktion ein von alloreaktiven (und somit die Abstoßung auslösenden) T-Lymphozyten unterschiedliches Zytokinprofil aufweisen. Durch ihre Aktivierung *in vitro* ist ihr Zytokinprofil anschließend zu bestimmen; vergleichbar mit der Möglichkeit, Th1- und Th2-Zellen bezüglich ihrer sezernierten Zytokine zu differenzieren.

### 6.1. Die Lebertransplantat-Spontantoleranz

Das Phänomen der Lebertransplantat-Spontantoleranz wurde bei Dark Agouti Ratten (DA mit dem Haplotyp RT1<sup>uvl</sup>) nach Übertragung von Lebertransplantaten aus Lewis-Spendertieren (LEW mit dem Haplotyp RT1<sup>l</sup>) untersucht. Hierbei handelt es sich um ein Lebertransplantat-spezifisches Phänomen, da andere vaskularisierte Organe aus LEW-Spendertieren von ihren DA-Empfängern abgestoßen werden (siehe hierzu auch die Einleitung).

---

Hingegen ist die akute Transplantatabstoßung zu beobachten, wenn LEW-Empfänger DA-Lebertransplantate erhalten. Sowohl die histologischen (s. Abb. 4.8), als auch die zellulären Analysen (s. Abb. 4.10) ließen keine Unterschiede zwischen beiden allogenen Gruppen erkennen. In beiden Gruppen wurden die Lebertransplantate von immunkompetenten Zellen der Empfänger infiltriert, wobei CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten das Infiltrat dominierten (s. Abb. 4.13). Dies wird als generelles Zeichen einer immunologischen Auseinandersetzung zwischen Immunsystem und Lebertransplantat gewertet. Ungeklärt ist, warum diese immunologische Auseinandersetzung in der Spontantoleranzgruppe zur Toleranz führte, während sie in der Abstoßungsgruppe eben in die Transplantatabstoßung mündete. Im Folgenden werden die wichtigsten eigenen Ergebnisse im Kontext aktueller Literatur diskutiert.

#### 6.1.1. Funktion von T-Lymphozyten mit und ohne CD45RC-Expression

Da aktivierte T-Lymphozyten entweder eine Immunantwort auslösen oder als Regulatorzellen eine Immunantwort hemmen können, wurde in dieser Arbeit damit begonnen, die im Transplantat befindlichen T-Lymphozyten der Abstoßungs- und Spontantoleranzgruppe auf ihre Aktivierung und ihr Zytokinprofil (siehe unten) zu untersuchen. Um u.a. naive von aktivierten T-Lymphozyten zu unterscheiden, wurde die Präsenz der CD45R Isoform CD45RC auf der Zelloberfläche (CD45RC<sup>neg</sup>, CD45RC<sup>pos</sup>) durchflußzytometrisch untersucht (s. auch Abb. 1.3). Dabei sind regulatorische T-Lymphozyten in der Regel in der Gruppe der CD45RC<sup>neg</sup> Zellen zu finden (Wood KJ, Sakaguchi S, 2003). Die Arbeitsgruppe um Ogawa wies nach Lebertransplantation charakteristische, mit der Transplantatazeptanz korrelierende intrahepatische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Ratte nach. Diese waren ebenfalls negativ für CD45RC (CD45RC<sup>neg</sup>) (Miyanari N et al., 1997).

---

Zhai et al. induzierten mit einer anti-CD4 Antikörpertherapie Toleranz gegenüber heterotopen Herztransplantaten. Dabei isolierten sie eine CD45RC<sup>pos</sup> T-Zellpopulation aus der Milz, für die sie einen suppressiven Effekt *in vitro* nachweisen konnten (Zhai Y et al., 2001). Nach dem in Abb. 1.3 dargestellten Zusammenhang zwischen der Expression von CD45R und der T-Zellfunktion scheint es sich bei diesen Zellen nicht um naive T-Lymphozyten zu handeln, sondern um so genannte langlebige Gedächtniszellen oder „revertant memory cells“. Diese Daten unterstreichen die Komplexität der T-Zell-Immunologie einerseits und die Schwierigkeit, definierte T-Zell-Subpopulationen eindeutig zu identifizieren. So ist die Frage, ob sich regulatorische T-Lymphozyten auch in Gedächtniszellen umbilden können, bisher nicht sicher zu beantworten.

Die eigenen Untersuchungen zur Aktivierung von T-Lymphozyten in Lebertransplantaten während der Frühphase zeigten ein dynamisches Verhältnis von CD45RC<sup>pos</sup> (naive T-Lymphozyten) und CD45RC<sup>neg</sup> (aktivierte T-Lymphozyten). In beiden allogenen Gruppen stieg das Verhältnis von aktivierten zu naiven intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten innerhalb von 3 Tagen nach Transplantation von 0,5 auf über 3 an. Dieses Verhältnis verringerte sich in beiden Gruppen bereits zwischen Tag 5 und 7 p.op. (s. hierzu auch Abb. 4.17). Inwieweit dies darauf zurückzuführen war, dass die aktivierten T-Lymphozyten über Apoptose eliminiert wurden, kann gegenwärtig nicht beantwortet werden. Hierzu sind auch keine Analysen durchgeführt worden. Es darf aber geschlussfolgert werden, dass die allogene Lebertransplantation, unabhängig vom späteren Schicksal der Transplantate, zu einer äußerst starken T-Zell-Aktivierung in der Frühphase führte. Dies scheint die Hypothese von Bishop et al. zu bestätigen, dass im Lebertransplantat bereits in der Frühphase die immunologische Entscheidung über Abstoßung und Toleranz getroffen wird (Bishop GA et al., 1997; Rokahr KL et al., 1998).

---

In der Spontantoleranzgruppe erhöhte sich in der Spätphase um den Tag 30 nach Lebertransplantation das Verhältnis von aktivierten zu naiven T-Lymphozyten noch einmal, bevor es sich schließlich dem Niveau der Syngenen Kontrollgruppe annäherte (s. Abb 4.17). Ob es sich bei diesen in der Spätphase isolierten CD45<sup>pos</sup> und CD45<sup>neg</sup> T-Lymphozyten um unterschiedliche Formen von Gedächtniszellen (siehe hierzu auch Abb. 1.3) oder um neu hinzugekommene naive bzw. aktivierte T-Lymphozyten handelte, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu entscheiden. Für das langfristige Bestehen von Lebertransplantat-Spontantoleranz erscheinen jedoch Gedächtniszellen als Träger von Toleranz nicht abwegig.

### 6.1.2. Zytokinmuster und T-Zellfunktion

Lebertransplantate der Abstoßungs- und Spontantoleranzgruppe zeigten initial eine starke Infiltration als Ausdruck einer Immunaktivierung. Aus dieser Aktivierung heraus steuerten hauptsächlich CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten den Ablauf der Immunantwort, in dem sie Zytokine ausschütteten, die weitere Zellgruppen z.B. Makrophagen, CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen aktivierten bzw. rekrutierten (Walsh PT et al., 2004). Für die T-Zellaktivierung kommt dabei dem Interleukin 2 eine zentrale Rolle zu, aber auch andere Interleukine, deren Rezeptorkomplexe die  $\gamma$ -Kette beinhalten, wie z.B. IL-4, IL-7, IL-15, können als Wachstumsfaktoren fungieren (Steiger J et al., 1995; Li XC et al., 1998). Zahlreiche Arbeitsgruppen untersuchten, ob bei Abstoßung und Toleranz unterschiedliche Zytokine dominieren. Das Th1-Th2-Paradigma (Th1 = Abstoßung, Th2 = Toleranz) scheint auch nach Organtransplantation Gültigkeit zu haben, jedoch sind die immunologischen Vorgänge so komplex, dass die Datenlage hierzu nicht einheitlich ist (Farges O et al., 1994; Farges O et al., 1995; Conti F et al., 1998; Minguela A et al., 1999; Ganschow R et al., 1999).

---

Dies ist im Grunde auch nicht zu erwarten, da es sich bei der Abstoßung um ein multizelluläres Geschehen handelt (siehe oben), an dem die zelluläre Immunität (vermittelt durch Th1-Zytokine) und humorale Immunität (vermittelt durch Th2-Zytokine) beteiligt ist. Dies bestätigten auch die eigenen Daten. Die aus den Lebertransplantaten beider allogenen Gruppen isolierten T-Lymphozyten zeigten in der Frühphase nach Transplantation eine starke Produktion von IL-2, gleichzeitig war auch das Th2-Zytokin IL-4 nachweisbar. Die isolierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten beider Gruppen sezernierten somit Th1-, als auch Th2-Zytokine (s. Abb. 4.18 – 4.20).

Insbesondere die Bedeutung von IL-2 für die T-Zellfunktion hat sich in den letzten Jahren grundlegend gewandelt (Malek TR, Bayer AL, 2004). IL-2 ist elementar für die Aktivierung und das Wachstum von T-Lymphozyten und gilt damit als ein Schlüsselzytokin für die T-Zell-abhängige Immunantwort. Weiterhin kann IL-2 bei T-Lymphozyten die Expression des antiapoptotischen Gens Bcl-2 steigern und so z.B. das langfristige Überleben von Gedächtniszellen sichern (Mueller DL et al., 1996; Van Parijs L et al., 1999). Somit sind hohe IL-2-Konzentrationen in der Spontantoleranzgruppe nicht überraschend. IL-2 wird inzwischen auch als entscheidendes Interleukin für die Entwicklung regulatorischer T-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) gesehen (Nelson BH, 2004). Welche Mechanismen in dem hier verwendeten Modell letztlich zur Transplantatabstoßung oder Transplantat-Spontantoleranz führten, kann zurzeit nicht beantwortet werden.

Nach einer anfänglichen Aktivierung und dem anschließenden Abklingen der Akutphase entwickelten sich, wie in Kapitel 4.5 gezeigt, in der Spontantoleranzgruppe CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die eine Besonderheit sowohl im Vergleich zu den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Milz als auch zu den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Syngenen Kontrollgruppe zeigten. Diese Zellen wurden erstmals ab Tag 30 p.op. nachgewiesen (Abb. 4.25), zu einem Zeitpunkt, als das Verhältnis von CD45RC<sup>neg</sup> zu CD45RC<sup>pos</sup> noch 4:1 war (Abb. 4.17).

---

Bis zum Tag 100 p.op. erniedrigte sich zwar der Anteil der CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten, doch konnte weiterhin IL-13 mRNA in den aufgereinigten T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Somit ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu unterscheiden, welche der beiden CD45RC – Populationen hierfür verantwortlich sind. Auch ist nicht geklärt, ob es sich bei den IL-13 produzierenden T-Lymphozyten um aktivierte (CD45RC<sup>neg</sup>) oder Gedächtniszellen (CD45RC<sup>neg</sup> bzw. CD45RC<sup>pos</sup>) handelt.

Über die Funktion von IL-13 bei immunologischen Vorgängen im Rahmen einer Lebertransplantation ist bislang wenig bekannt. Die publizierten Daten über IL-13 beziehen sich vor allem auf dessen Beteiligung bei allergischen Reaktionen (de Vries JE, Zurawski G, 1995; Punnonen J et al., 1993) oder Leishmaniosen (Bourreau E et al., 2001). Für die Transplantation zeigten Gorczynski et al., dass IL-13 zusammen mit einem anti-IL-12 Antikörper und dendritischen Spenderzellen die Lebensdauer allogener Hauttransplantate signifikant verlängerte (Gorczynski RM et al., 1996). Aus diesen Mäusen isolierte Milzzellen zeigten zudem eine erhöhte IL-4 und IL-10 Produktion. IL-13 wird von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sezerniert (McKenzie AN et al., 1993) und zählt zu den Th2-Zytokinen (Brown KD et al., 1989; McKenzie AN, 2000). Es wirkt regulierend auf B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (McKenzie AN et al., 1993; Minty A et al., 1993; Punnonen J et al., 1993). Weiterhin ist IL-13 in der Lage, die Produktion anderer Zytokine, wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , zu inhibieren (de Waal Malefyt R et al., 1993).

## 6.2. Weitere Phänomene zur Lebertransplantat-Toleranz

Die Möglichkeit, dass Regulatorzellen periphere Toleranz induzieren, stellt zwar einen äußerst attraktiven Ansatz dar, doch sind seit langem weitere leberspezifische Besonderheiten bekannt, die ebenso zur Erklärung der Lebertransplantat-Toleranz beitragen könnten. Im Folgenden werden die wichtigsten Phänomene hierzu diskutiert.

---

### 6.2.1. Lösliche Formen von MHC-Klasse-I Molekülen

Der Nachweis löslicher Formen von MHC-Klasse-I Molekülen im Serum (van Rood JJ et al., 1970; Charlton RK, Zmijewski CM, 1970) war mit großen Erwartungen verknüpft, da dies die zuvor von Sir Roy Calne beschriebene Fähigkeit von Lebertransplantaten erklären könnte, trotz vollständiger MHC-Inkompatibilität ohne Immunsuppression akzeptiert zu werden (Calne RY et al., 1969). In der Tat wurden bei lebertransplantierten Patienten mit stabiler Transplantatfunktion große Mengen löslicher, von Hepatozyten produzierter HLA-Moleküle nachgewiesen (Calne RY, 2000). Ihnen werden immunregulatorische Fähigkeiten zugesprochen (Puppo F et al., 1995), wobei ein wesentlicher Mechanismus zu sein scheint, dass sie an den T-Zellrezeptor aktivierter T-Lymphozyten binden und so Apoptose induzieren (Zavazava N, Krönke M, 1996; Geissler EK et al., 1998). Auch kann lösliches MHC transplantat-spezifische Antikörper effektiv blockieren (Kamada N et al., 1980). Eine klinische Umsetzung dieses interessanten Phänomens ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht abzusehen, da die experimentellen Daten nicht eindeutig sind. So werden gerade während der Abstoßung große Mengen löslicher MHC-Moleküle freigesetzt, ohne dass ein hemmender Einfluss zu beobachten war (Davies HS et al., 1989). Außerdem können Injektionen mit löslichen MHC-Molekülen zum Zeitpunkt der Transplantation die Abstoßung nicht immer verhindern (Priestley CAM et al., 1989; Sumimoto R, Kamada N, 1990).

### 6.2.2. Antigenmasse und Mikrochimärismus

Ein weiterer leberspezifischer Effekt wird in der Menge der transplantierten Alloantigene gesehen. Dass eine „ungewöhnlich“ hohe Antigenmasse das Immunsystem hemmen kann, verdeutlichen experimentelle Multiorgantransplantationen.

---

So führte die simultane Transplantation zweier Nieren und Herzen in Kombination mit der Übertragung von  $10^8$  Spenderleukozyten zur langfristigen Akzeptanz dieser Organe (Sun J et al., 1996). Auch die kombinierte Leber-Dünndarmtransplantation zeigte einen positiven Effekt der Leber auf die Akzeptanz des sehr immunogenen Dünndarms (Meyer D et al., 2000). Leider sind diese mikrochirurgisch aufwendigen Experimente in ihrer Aussagekraft nicht eindeutig, um hieraus zu einer allgemeinen Schlussfolgerung zu kommen. So beschrieben Murase et al., dass die „Cluster-Transplantation“ von Leber, Dünndarm (beide sehr reich an Leukozyten), Magen, Colon und Pankreas nicht zu einer verbesserten Akzeptanz führte (Murase N et al., 1990). Inwieweit in diesem Versuchsansatz andere immunologische Phänomene das der Antigenlast überdecken, kann zur Zeit nicht abgeschätzt werden. Diese Versuche verdeutlichen aber die Problematik solcher experimentellen Ansätze. Hingegen gilt als gesichert, dass verkleinerte Lebertransplantate zu einem viel geringeren Prozentsatz toleriert werden als nicht-resezierte Transplantate (Shiraishi M et al., 1994).

Eine intensiv untersuchte Auswirkung dieser Antigenmasse in Form mobiler immunkompetenter Zellen ist der Mikrochimärismus (u.a. Gassel HJ et al, 2001). Seine zelluläre Grundlage sind die so genannten „passenger leukocytes“, die mit dem Organtransplantat in den Organismus gelangen und dort dauerhaft in verschiedenen lymphatischen Organen persistieren. Erste Beobachtungen hierzu wurden von Ray D. Owens bereits im Jahre 1945 publiziert (Owen R, 1945). Danach enthielten zweieiige Zwillingssäuger, die über einen gemeinsamen Blutkreislauf in der Plazenta miteinander verbunden waren (sog. „Freemartin“-Kälber), Blutzellen oder blutbildende Zellen vom jeweils anderen Zwilling, die auch nach der Geburt der Tiere dauerhaft nachzuweisen waren. Dies hatte zur Folge, dass Blut, aber auch, wie die Gruppe um Medawar zeigen konnte, Hauttransplantate des jeweils anderen Zwillingss toleriert wurden (Anderson D et al., 1951).

---

Diese durch das Transplantat induzierte Koexistenz der hämatopoetischen Zellen von Spender und Empfänger sieht die Gruppe um Thomas E. Starzl (Pittsburgh, USA) als Basis für langfristiges Überleben von Organtransplantaten. Als relevanten Mechanismus postulieren sie die selektive Deletion alloreaktiver T-Lymphozyten (Starzl TE et al., 1993; Qian S et al., 1994). Hingegen zeigen andere Untersuchungen, dass „passenger leukocytes“ nicht dauerhaft im Empfänger überleben müssen, um stabile transplantatspezifische Toleranz zu gewährleisten (Garnier JL et al., 1997; Hamano K et al., 1996; Bishop GA et al., 1996). Auch neuere Daten belegen ihre wichtige Rolle als Immunmodulatoren in der Frühphase nach Transplantation (Ko S et al., 1999).

### 6.2.3. T-Zell-Apoptose durch Vernachlässigung oder Aktivierung

Bishop et al. haben den Mechanismus ihrer Hypothese zur Lebertransplantat-Spontantoleranz in mehreren Schritten konkretisiert (Bishop GA et al., 2002). Grundlage bleibt weiterhin das Auswandern der mitübertragenden intrahepatischen Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten des Empfängers, wo sie zu einer raschen und starken Immunaktivierung führen. Hieraufhin wandern („homen“) die aktivierten alloreaktiven T-Lymphozyten des Empfängers in das Lebertransplantat. Bedingt durch die Größe der Leber sollen diese Zellen keine optimalen Bedingungen zum Überleben vorfinden, in erster Linie die hierfür notwendigen Zytokine. Dies führt schließlich zu ihrer Apoptose (Bishop GA et al., 2002). Dieser durch Vernachlässigung induzierte Zelltod ist von Bertolino et al. als ein deletärer Mechanismus für zytotoxische T-Lymphozyten beschrieben worden (Bertolino P et al., 1999). In den eigenen Experimenten ist das Phänomen der Apoptose zwar nicht untersucht worden, doch deuteten auch die eigenen Daten auf eine eher ausgeprägte Immunantwort im Lebertransplantat hin.

---

Zu dieser Form der T-Zell-Apoptose ist die Induktion von Apoptose im Rahmen der T-Zellaktivierung ein bereits seit längerem bekanntes Phänomen („activation-induced cell death“, AICD; Kabelitz D, Janssen O, 1997; Van Hoffen E et al., 1998). AICD zur Eliminierung alloreaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten ist nach experimenteller Lebertransplantation in zahlreichen Arbeiten beschrieben worden, auch von der eigenen Arbeitsgruppe (z.B. Meyer D et al., 2001). Dieser Mechanismus könnte somit in der Frühphase nach Transplantation sehr wirksam sein, um die „erste Welle“ an alloreaktiven T-Lymphozyten abzufangen. In der Spätphase könnte AICD dann protektiv wirken, um Transplantat-Toleranz langfristig zu erhalten. Diese Deletion ist jedoch nicht vollständig, da alloreaktive T-Lymphozyten nach der Toleranzentwicklung in verschiedenen *in vitro* Testsystemen weiterhin nachzuweisen sind (Dahmen U et al., 1994). Dieser als „split tolerance“ bezeichnete Zustand zeigt, dass *in vivo* ein weiterer „aktiver“ Mechanismus vorhanden sein muss, der die Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten kontrolliert. Diese Funktion könnten regulatorische T-Lymphozyten erfüllen.

### 6.3. Das Lebertransplantat: ein immunologisches Multitalent?

Dieser Überblick verdeutlicht die Spannbreite verschiedenster immunologischer Phänomene, die nach einer Lebertransplantation beobachtet werden können. Mit all diesen Phänomenen und Effekten lässt sich Lebertransplantat-Toleranz bzw. Spontantoleranz bisher jedoch nicht vollständig erklären. Auch ein in sich geschlossenes, durch Experimentaldaten abgesichertes Modell hierzu ist derzeit nicht in Sicht. Aus diesem Grund ist die Wertigkeit dieser einzelnen Phänomene für die Lebertransplantat-Toleranz auch nicht eindeutig abzuschätzen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind regulatorische T-Lymphozyten äußerst attraktiv für die Induktion peripherer Toleranz, doch ist ihre vermutete elementare Bedeutung für die Lebertransplantat-Spontantoleranz bisher nicht zweifelsfrei geklärt.

---

In der vorliegenden Arbeit wurde in der Spontantoleranzgruppe eine Subpopulation von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Spätphase nach Lebertransplantation identifiziert, die nach einer *in vitro* Stimulierung das Th-2 Zytokin IL-13 bildeten. Inwieweit diese Zellen für die Lebertransplantat-Spontantoleranz wichtig sind, kann anhand der eigenen Daten zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig entschieden werden. Ganz sicher aber unterstreichen diese Ergebnisse das immunologische Potential der Leber. Zukünftige Untersuchungen hierzu werden somit mit großer Sicherheit noch weitere hochinteressante immunologische Phänomene zutage fördern.

---

## 7. Ausblick

---

Aus Lebertransplantaten der Spontantoleranzgruppe wurden in der Spätphase CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten isoliert, für die nach ihrer Aktivierung *in vitro* mRNA für das Zytokin IL-13 nachgewiesen wurde. Aktuell gelang auch der Nachweis des Proteins im Zellkulturüberstand. Wie in dieser Arbeit gezeigt, lassen sich die intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in CD45RC<sup>pos</sup> und CD45RC<sup>neg</sup> Zellen einteilen. Welche der beiden Subpopulation IL-13 produziert, soll nun in weiterführenden Arbeiten geklärt werden. Erste Experimente hierzu waren bereits sehr viel versprechend (Gassel HJ et al., 2002). Weiter ist zu untersuchen, ob die IL-13-positiven T-Lymphozyten über einen supprimierenden Effekt verfügen, um sie schließlich als Regulatorzellen in weiterführenden Transferversuchen *in vivo* einsetzen zu können. Auch wäre interessant zu klären, in welcher Region der Leber sich diese Zellen befinden und ob sie dort gebildet werden. Erkenntnisse hierzu könnten möglicherweise zur gezielten Generierung dieser Zellen genutzt werden.

Auch könnte sich die Präsenz dieser IL-13-positiven T-Lymphozyten im Lebertransplantat als relevanter Biomarker für eine stabile Transplantatfunktion herausstellen. Molekular-immunologische Marker zum sicheren Nachweis von Transplantat-Toleranz sind von allergrößter Bedeutung, um immunsuppressive Medikamente sicher absetzen zu können oder zumindest doch drastisch zu reduzieren (siehe hierzu auch die Einleitung). Dieser Nachweis könnte z.B. anhand von Biopsaten durchgeführt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt handelt es sich hierbei um theoretische Überlegungen, da zur möglichen Bedeutung von IL-13 bzw. IL-13 produzierenden T-Lymphozyten für die Lebertransplantat-Toleranz zu wenig bekannt ist.

---

## 8. Zusammenfassung

---

Die Leber verfügt über einzigartige immunologische Eigenschaften, wobei die Lebertransplantat-Spontantoleranz eine der beeindruckendsten ist. Dies steht im Gegensatz zum zentralen Dogma der Transplantationsimmunologie, wonach MHC-differente Transplantate ohne Immunsuppression abgestoßen werden. Die Spontantoleranz entwickelt sich aus der vom Lebertransplantat ausgelösten Immunantwort, während andere MHC-differente Organ-transplantate im Rahmen einer solchen Immunantwort irreversibel zerstört werden.

Zielsetzung dieser Arbeit war, die immunologischen Vorgänge im Lebertransplantat bei Abstoßung und Spontantoleranz näher zu untersuchen. Deshalb wurden die intrahepatischen T-Lymphozyten auf ihr Zytokinprofil (Th1/Th2 Zytokine) und ihre CD45RC Expression hin untersucht. Dies geschah in der Frühphase bis Tag 7 und in der Spätphase bis Tag 100 nach Lebertransplantation. Mit diesem experimentellen Design wurde überprüft, ob aus der frühen Aktivierung nach Lebertransplantation je nach Präsenz von Th1- oder Th2-Zytokinen entweder Abstoßung oder Spontantoleranz entsteht.

Das Phänomen der Lebertransplantat-Spontantoleranz wurde in der Ratte mit der Zuchtlinie Dark Agouti (DA) nach Übertragung von Lebertransplantaten aus Lewis-Spendertieren (LEW) untersucht. Andere vaskularisierte Organe aus LEW-Spendertieren wurden dagegen von ihren DA-Empfängern abgestoßen. Dienten DA-Tiere als Leberspender und LEW-Tiere als Empfänger, so war ebenso eine akute Transplantatabstoßung zu beobachten.

Die Quantifizierung und Phänotypisierung der Leukozyten aus den Lebertransplantaten der Spontantoleranzgruppe und der Abstoßungsgruppe zeigten, dass es bereits in der Frühphase nach Transplantation zu einer starken Infiltration mit Leukozyten des Empfängers kam.

---

Bereits am Tag 3 p.op. waren in diesen Lebertransplantaten nahezu nur noch Leukozyten der Empfänger nachzuweisen. Auch in spontantolerierten LEW-Lebertransplantaten wurde dies beobachtet. Weiter wurde die Expression der Isoformen des Oberflächenmoleküls CD45RC auf den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten untersucht, da sich hierdurch naive von aktivierten Zellen unterscheiden lassen. Während der Frühphase zeigte sich ein dynamisches Verhältnis von CD45RC<sup>pos</sup> (naive T-Lymphozyten) und CD45RC<sup>neg</sup> (aktivierte T-Lymphozyten). In beiden allogenen Gruppen stieg dieses Verhältnis innerhalb von 3 Tagen nach Transplantation von 0,5 auf über 3 an. Bereits zwischen Tag 5 und 7 p.op. verringert sich dieses Verhältnis wieder in beiden Gruppen. In der Spätphase um den Tag 30 nach Lebertransplantation erhöhte sich in der Spontantoleranzgruppe das Verhältnis von aktivierten zu naiven T-Lymphozyten noch einmal, bevor es sich schließlich dem Niveau der Syngenen Kontrollgruppe annäherte.

Für die intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten beider allogener Gruppen wurde in der Frühphase nach Transplantation eine deutliche Anwesenheit von IL-2 und IL-2 mRNA nachgewiesen. In dieser Phase sezernierten sie auch die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10. Dies war unabhängig davon, ob die T-Lymphozyten aus Lebertransplantaten der Abstoßungs- oder Spontantoleranzgruppe stammten. Somit konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Th2-Zytokinen für die Induktion von Spontantoleranz notwendig ist bzw. ihre Abwesenheit zur Transplantatabstoßung führt.

In der Spätphase nach Transplantation wurden aus den spontantoleranten Lebertransplantaten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten isoliert, für die nach einer *in vitro*-Stimulierung IL-13 mRNA nachzuweisen war. Diese Fähigkeit ließ sich bis zum Versuchsende am Tag 100 verfolgen. Hingegen brachten Analysen von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die zum gleichen Zeitpunkt aus den Milzen dieser Tiere isoliert wurden, für dieses Zytokin kein Ergebnis.

---

Auch in der Syngenen Kontrollgruppe waren die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die aus den Lebertransplantaten und Milzen isoliert wurden, nicht in der Lage, dieses Zytokin zu produzieren. IL-13 zählt zu den Th2-Zytokinen, das regulierend auf immunkompetente Zellen wirkt und die Produktion verschiedener inflammatorischer Zytokine hemmt. Diese IL-13-positiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten stellen somit attraktive Kandidaten für Zellen mit einem regulatorischen Potential dar, die zur Erhaltung der Langzeitfunktion von Lebertransplantaten entscheidend sein könnten.

Die Leber mit ihren einzigartigen immunologischen Fähigkeiten verbirgt noch zahlreiche Geheimnisse. Unstrittig ist, dass weiterführende Untersuchungen zu neuen Erkenntnissen über die Immunbiologie IL-13-positiver T-Lymphozyten im Besonderen und zur Leberimmunologie im Allgemeinen führen werden.

---

## 9. Literaturverzeichnis

---

Akdis CA und Blaser K. *Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression*. Immunology 2001; 103: 131 - 136

Aldersley MA und O'Grady JG. *Hepatic disorders. Features and appropriate management*. Drugs 1995; 49: 83 - 102

Anderson D, Billingham R, Lamkin G, Medawar P. *Use of Skin Grafting to Distinguish between Monzygotic and Dizygotic Twins in Cattle*. Heredity 1951; 5: 379 - 389

Bell EB, Sparshott SM, Bunce C. *CD4+ T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen - a unifying concept*. Immunol Today 1998; 19: 60 - 64

Bertolino P, Trescol-Biemont MC, Thomas J, Fazekas de St GB, Pihlgren M, Marvel J, Rabourdin-Combe C. *Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance*. Int Immunol 1999; 11: 1225 - 1238

Bishop GA, Sun J, DeCruz DJ, Rokahr KL, Sedgwick JD, Sheil AG, Gallagher ND, McCaughan GW. *Tolerance to rat liver allografts. III. Donor cell migration and tolerance-associated cytokine production in peripheral lymphoid tissues*. J Immunol 1996; 156: 4925 - 4931

Bishop GA, Sun J, Sheil AG, McCaughan GW. *High-dose/activation-associated tolerance: a mechanism for allograft tolerance*. Transplantation 1997; 64: 1377 - 1382

Bishop GA, Wang C, Sharland AF, McCaughan G. *Spontaneous acceptance of liver transplants in rodents: evidence that liver leucocytes induce recipient T-cell death by neglect*. Immunol Cell Biol 2002; 80: 93 - 100

Bourreau E, Prevot G, Pradinaud R, Launois P. *Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12*. J Infect Dis 2001; 183: 953 - 959

Brown KD, Zurawski SM, Mosmann TR, Zurawski G. *A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes*. J Immunol 1989; 142: 679 - 687

---

Bunce C und Bell EB. *CD45RC isoforms define two types of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen.* J Exp Med 1997; 185: 767 - 776

Calne RY. *Immunological tolerance - the liver effect.* Immunol Rev 2000; 174: 280 - 282

Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, Binns RM, Davies DA. *Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts.* Nature 1969; 223: 472 - 476

Calne R, Sells R, Marshall VC. *Multiple organ graft in pig: techniques and results of pancreatic, hepatic, cardiac, and renal allografts.* Brit J Surg 1972; 59: 969 - 977

Cantor HM und Dumont AE. *Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system.* Nature 1967; 215: 744 - 745

Charlton RK und Zmijewski CM. *Soluble HL-A7 antigen: localization in the beta-lipoprotein fraction of human serum.* Science 1970; 170: 636 - 637

Conti F, Boulland ML, Leroy-Viard K, Chereau C, Dousset B, Soubrane O, Weill B, Calmus Y. *Low level of interleukin 10 synthesis during liver allograft rejection.* Lab Invest 1998; 78: 1281 - 1289

Dahmen U, Qian S, Rao AS, Demetris AJ, Fu F, Sun H, Gao L, Fung JJ, Starzl TE. *Split tolerance induced by orthotopic liver transplantation in mice.* Transplantation 1994; 58: 1 - 8

Davies HS, Pollard S, Calne RY. *Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients.* Transplantation 1989; 47: 524 - 527

de Vries JE und Zurawski G. *Immunoregulatory properties of IL-13: Its potential role in atopic disease.* Arch Allergy Immunol 1995; 106: 175 - 179

de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, de Vries JE. *Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production and cytotoxic function of human monocytes.* J Immunol 1993; 151: 6370 - 6381

Devlin J, Doherty D, Thomson L, Wong T, Donaldson P, Portmann B, Williams R. *Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation.* Hepatology 1998; 27: 926 - 933

Egawa H, Martinez OM, Quinn MB, Villanueva JC, So S, Esquivel CO, Krams SM. *Acute liver allograft rejection in the rat. An analysis of the immune response.* Transplantation 1995; 59: 97 - 102

- 
- Ehrlich P. *Die von mir herrührende Hämatoxylin-Lösung*. Z Wiss Mikr 1886
- Engemann R, Gassel HJ, Lafrenz E, Stoffregen C, Thiede A . *Transplantation tolerance after short-term administration of 15-deoxyspergualin in orthotopic rat liver transplantation*. Transplant Proc 1987; 19: 4241 - 4244
- European FK506 multicentre liver study group. *Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in prevention of liver allograft rejection*. Lancet 1995; 344: 423 - 428
- Farges O, Morris PJ, Dallman MJ. *Spontaneous acceptance of liver allografts in the rat. Analysis of the immune response*. Transplantation 1994; 57: 171 - 177
- Farges O, Morris PJ, Dallman MJ. *Spontaneous acceptance of rat liver allografts is associated with an early downregulation of intragraft interleukin-4 messenger RNA expression*. Hepatology 1995; 21: 767 - 775
- Ganschow R, Nolkemper D, Hoffmann T, Giesecking J, Rogiers X, Broelsch CE, Burdelski M. *Influence of Th1 and Th2 cytokine patterns on graft acceptance in pediatric liver transplantation*. Transplant Proc 1999; 31: 465 - 466
- Garnier JL, Touraine JL, Gebuhrer L. *No detectable microchimerism in long-term tolerant recipients of living-donor kidneys*. Transplant Proc 1997; 29: 1181
- Gassel HJ und Steger U. *Liver transplantation in the rat*. Timmermann W, Gassel HJ, Ulrichs K, Zhong R, Thiede A. Organ transplantation in rats and mice. Springer Verlag. Berlin. 1998; 123 - 131
- Gassel HJ, Otto C, Gassel AM, Meyer D, Steger U, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. *Tolerance of rat liver allografts induced by short-term selective immunosuppression combining monoclonal antibodies directed against CD25 and CD54 with subtherapeutic cyclosporine*. Transplantation 2000; 69: 1058-1067
- Gassel HJ, Otto C, Klein I, Steger U, Meyer D, Gassel AM, Ulrichs K, Thiede A. *Persistence of stable intragraft cell chimerism in rat liver allografts after drug-induced tolerance*. Transplantation 2001; 71: 1848-1852
- Gassel HJ und Otto C. *Mechanisms of Immune tolerance after orthotopic liver transplantation*. Transplant Linc 2002; 2: 49-58
- Gassel HJ, Schmitz P, Kauczok J, Grimmer J, Steger U, Timmermann W, Ulrichs K, Otto C. *The presence of an interleukin-13 producing intrahepatic CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T cell population correlates with liver tolerance*. Transplantation [Suppl] 2002; 74: 1291

---

Geissler EK, Scherer MN, Graeb C. *Soluble donor MHC class I antigen inhibits immunologic priming in vitro and in vivo.* *Transpl Int* 1998; 11 Suppl 1: 357 - 360

Gillespie KM, Saoudi A, Kuhn J, Whittle CJ, Druet P, Bellon B, Mathieson PW. *Th1/Th2 cytokine gene expression after mercuric chloride in susceptible and resistant rat strains.* *Eur J Immunol* 1996; 26: 2388 - 2392

Gorczyński RM, Cohen Z, Fu XM, Hua Z, Sun Y, Chen Z. *Interleukin-13, in combination with anti-interleukin-12, increases graft prolongation after portal venous immunization with cultured allogeneic bone marrow-derived dendritic cells.* *Transplantation* 1996; 62: 1592 - 1600

Hamano K, Rawsthorne MA, Bushell AR, Morris PJ, Wood KJ. *Evidence that the continued presence of the organ graft and not peripheral donor microchimerism is essential for maintenance of tolerance to alloantigen in vivo in anti-CD4 treated recipients.* *Transplantation* 1996; 62: 856 - 860

Jain A, Nalesnik M, Reyes J, Pokharna R, Mazariegos G, Green M, Eghtesad B, Marsh W, Cacciarelli T, Fontes P, Abu-Elmagd K, Sindhi R, Demetris J, Fung J. *Posttransplant lymphoproliferative disorders in liver transplantation: a 20-year experience.* *Ann Surg* 2002; 236: 429 - 436

Kabelitz D und Janssen O. *Antigen-induced death of T-lymphocytes.* *Front Biosci* 1997; 2: 61 - 77

Kamada N, Brons G, Davies HS. *Fully allogeneic liver grafting in rats induces a state of systemic nonreactivity to donor transplantation antigens.* *Transplantation* 1980; 29: 429 - 431

Kamada N, Davies HS, Roser B. *Reversal of transplantation immunity by liver grafting.* *Nature* 1981; 292: 840 - 842

Kamada N und Wight DGD. *Antigen-specific immunosuppression induced by liver transplantation in the rat.* *Transplantation* 1984; 38: 217 - 221

Knolle PA und Gerken G. *Local control of the immune response in the liver.* *Immunol Rev* 2000; 174: 21 - 34

Ko S, Deiwick A, Jager MD, Dinkel A, Rohde F, Fischer R, Tsui TY, Rittmann KL, Wonigeit K, Schlitt HJ. *The functional relevance of passenger leukocytes and microchimerism for heart allograft acceptance in the rat.* *Nat Med* 1999; 5: 1292 - 1297

Kruse JJ, Bart CI, Leer JW, Wondergem J. *Detection and quantitative measurement of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) gene expression using a semi-nested competitive PCR assay.* *Cytokine* 1999; 11: 179 - 185

---

Lee S, Charter AC, Chandler JG, Orloff M.J. *A technique for orthotopic liver transplantation in the rat.* Transplantation 1973; 16: 664 - 667

Lenardo MJ. *Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis.* Nature 1991; 353: 858 - 861

Li XC, Roy-Chaudhury P, Hancock WW, Manfro R, Zand MS, Li Y, Zheng XX, Nickerson PW, Steiger J, Malek TR, Strom TB. *IL-2 and IL-4 double knockout mice reject islet allografts: a role for novel T cell growth factors in allograft rejection.* J Immunol 1998; 161: 890 – 896

Lohoff M, Gessner A, Bogdan C, Rollinghoff M. *The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis.* Int Arch Allergy Immunol; 1998; 115(3):191-202

Losada I, Cuervas-Mons V, Millan I, Damaso D. *Early infection in liver transplant recipients: incidence, severity, risk factors and antibiotic sensitivity of bacterial isolates.* Enferm Infecc Microbiol Clin 2002; 20: 422 - 430

Lowry RP und Takeuchi T. *The TH-1, TH-2 paradigm and transplantation tolerance: cellular and molecular mechanisms.* Alexander JW und Good RA. Transplantation tolerance induction. Springer-Verlag. Heidelberg. 1996; 91 - 111

Malek TR und Bayer AL. *Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2.* Nat Rev Immunol 2004; 4: 665 - 674

McKenzie AN. *Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13.* Pharmacol Ther 2000; 88: 143 - 151

McKenzie AN, Culpepper J, de Waal Malefyt R, Briere F. *Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function.* Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 3735 - 3739

Meyer D, Otto C, Gasser M, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. *Concomitant liver transplantation reduces the rate of chronic small bowel allograft rejection.* Transplant Proc 2002; 34: 1040 - 1041

Meyer D, Otto C, Rummel C, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. *"Tolerogenic effect" of the liver for a small bowel allograft.* Transpl Int 2000; 13 Suppl 1: 123 - 126

Meyer D, Thorwarth W, Otto C, Gasser M, Gassel H, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. *Early T-cell inactivation and apoptosis-critical events for tolerance induction after allogeneic liver transplantation.* Transplant Proc 2001; 33: 256 - 258

---

Minguela A, Torio A, Marin L, Sanchez-Bueno F, Garcia-Alonso AM, Ontanon J, Parrilla P, Alvarez-Lopez MR. *Implication of Th1, Th2, and Th3 cytokines in liver graft acceptance.* Transplant Proc 1999; 31: 519 - 520

Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liautun P, Miloux B. *Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune response.* Nature 1993; 362: 248 - 250

Miyanari N, Yamaguchi Y, Matsuno K, Tominaga A, Goto M, Ichiguchi O, Mori K, Ogawa M. *Persistent infiltration of CD45RC- CD4+ T cells, Th2-like effector cells, in prolonging hepatic allografts in rats pretreated with a donor-specific blood transfusion.* Hepatology 1997; 25: 1008 - 1013

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J Immunol 1986; 136: 2348 - 2357

Mueller DL, Seiffert S, Fang W, Behrens TW. *Differential regulation of bcl-2 and bcl-x by CD3, CD28, and the IL-2 receptor in cloned CD4+ helper T cells. A model for the long-term survival of memory cells.* J Immunol 1996; 156: 1764 - 1771

Murase N, Demetris A, Kim DG, Todo S, Fung JJ, Starzl TE . *Rejection of multivisceral allografts in rats: a sequential analysis with comparison to isolated orthotopic small bowel and liver grafts.* Surgery 1990; 108: 880 - 889

Nelson BH. *IL-2, regulatory T cells, and tolerance.* J Immunol 2004; 172: 3983 - 3988

Neumann H-G. *Immunsuppressiva.* Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin, Oxford. 1996; 811 - 814

Ormond DG, de Boer WB, Kierath A, Bell R, Shilkin KB, House AK, Jeffrey GB, Reed WD. *Banff schema for grading liver allograft rejection: utility in clinical practice.* Liver Transpl Surg 1999; 5: 261 - 268

Owen R. *Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins.* Science 1945; 102: 400 - 401

Penn I. *Posttransplant de novo tumors in liver allograft recipients.* Liver Transpl Surg 1996; 2: 52 - 59

Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos A. *CD45: new jobs for an old acquaintance.* Nat Immunol 2001; 2: 389 - 396

---

Powrie F und Mason D. *The MRC OX-22- CD4+ T cells that help B cells in secondary immune responses derive from naive precursors with the MRC OX-22+ CD4+ phenotype.* J Exp Med 1989; 169: 653 - 662

Powrie F und Mason D. *OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset.* J Exp Med 1990a; 172: 1701 - 1708

Powrie F und Mason D. *Subsets of rat CD4+ T cells defined by their differential expression of variants of the CD45 antigen: developmental relationships and in vitro and in vivo functions.* Curr Top Microbiol Immunol 1990b; 159: 79 - 96

Priestley CAM, Dalchau R, Sawyer GJ, Fabre JW. *A detailed analysis of the potential of water-soluble classical class I MHC molecules for the suppression of kidney allograft rejection and in vitro cytotoxic T cell responses.* Transplantation 1989; 48: 1031 - 1038

Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. *Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 3730 - 3734

Puppo F, Scudeletti M, Indiveri F, Ferrone S. *Serum HLA class I antigens: markers and modulators of an immune response?* Immunol Today 1995; 16: 124 - 127

Qian S, Demetris A, Murase N, Rao AS, Fung J, Starzl TE. *Murine liver allograft transplantation: Tolerance and donor cell chimerism.* Hepatology 1994; 19: 916 - 923

Ramos H, Reyes J, Abu-Elmagd K, Zeevi A, Reinsmoen N, Tzakis A, Demetris A, Fung J, Flynn B, McMichael J. *Weaning of immunosuppression in long-term liver transplant recipients.* Transplantation 1995; 59: 212 - 217

Rasmussen A, Davies H, Jamieson N, Evans D, Calne R. *Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival.* Transplantation 1995; 59: 919 - 921

Rokahr KL, Sharland AF, Sun J, Wang C, Sheil AG, Yan Y, McCaughan GW, Bishop GA. *Paradoxical early immune activation during acceptance of liver allografts compared with rejection of skin grafts in a rat model of transplantation.* Immunology 1998; 95: 257 - 263

Sarawar SR, Sparshott SM, Sutton P, Yang CP, Hutchinson IV, Bell EB. *Rapid re-expression of CD45RC on rat CD4 T cells in vitro correlates with a change in function.* Eur J Immunol 1993; 23: 103 - 109

---

Schlitt HJ, Gubernatis G, Pichlmayr R. *Organtransplantation*. Siewert JR. Chirurgie. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York. 1998; 771 - 788

Shiraishi M, Csete ME, Yasunaga C, Drazan KE, Jurim O, Cramer DV, Busuttil RW, Shaked A. *Regeneration-induced accelerated rejection in reduced-size liver grafts*. *Transplantation* 1994; 57: 336 - 340

Siegling A, Lehmann M, Platzer C, Emmrich F, Volk HD. *A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats*. *J Immunol Methods* 1994; 177: 23 - 28

Sparshott SM und Bell EB. *Membrane CD45R isoform exchange on CD4 T cells is rapid, frequent and dynamic in vivo*. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2573 - 2578

Spickett GP, Brandon MR, Mason D, Williams AF, Woollett GR. *MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen*. *J Exp Med* 1983; 158: 795 - 810

Starzl TE, Demetris A, Murase N, Thomson AW, Trucco M, Ricordi C. *Donor cell chimerism permitted by immunosuppressive drugs: a new view of organ transplantation*. *Immunol Today* 1993; 14: 326 - 332

Starzl TE, Marchioro TL, Porter KA. *Experimental and clinical observations after homotransplantation of the whole liver*. *Rev Int Hepatol* 1965; 15: 1447 - 1480

Steiger J, Nickerson PW, Streurer W, Moscovitch-Lopatin M, Strom TB. *IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allograft*. *J Immunol* 1995; 155: 489 - 498

Subra JF, Cautain B, Xystrakis E, Mas M, Lagrange D, van der Heijden H, van de Gaar MJ, Druet P, Fournie GJ, Saoudi A, Damoiseaux J. *The balance between CD45RC<sup>high</sup> and CD45RC<sup>low</sup> CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled*. *J Immunol* 2001; 166: 2944 - 2952

Sumimoto R und Kamada N. *Specific suppression of allograft rejection by soluble class I antigen and complexes with monoclonal antibody*. *Transplantation* 1990; 50: 678 - 682

Sun J, McCaughan GW, Gallagher ND, Sheil AG, Bishop GA. *Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation*. *Transplantation* 1995; 60: 233 - 236

---

Sun J, McCaughan GW, Matsumoto Y, Sheil AG, Gallagher ND, Bishop GA. *Tolerance to rat liver allografts. I. Differences between tolerance and rejection are more marked in the B cell compared with the T cell or cytokine response.* Transplantation 1994; 57: 1349 - 1357

Sun J, Sheil AG, Wang C, Wang L, Rokahr K, Sharland A, Jung SE, Li L, McCaughan GW, Bishop GA. *Tolerance to rat liver allografts: IV. Acceptance depends on the quantity of donor tissue and on donor leukocytes.* Transplantation 1996; 62: 1725 - 1730

Swain SL, Croft M, Dubey C, Haynes L, Rogers P, Zhang X, Bradley LM. *From naive to memory T cells.* Immunol Rev 1996; 150: 143 - 167

Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y. *Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients.* Transplantation 2001; 72: 449 - 454

Tu Y, Arima T, Flye MW. *Rejection of spontaneously accepted rat liver allografts with recipient interleukin-2 treatment or donor irradiation.* Transplantation 1997; 63: 177 - 181

Van Hoffen E, Van Wichen DF, Leemans JC, Broekhuizen RA, Bruggink AH, De Boer M, De Jonge N, Kirkels H, Slootweg PJ, Gmelig-Meyling FH, De Weger RA. *T cell apoptosis in human heart allografts: association with lack of co-stimulation?* Am J Pathol 1998; 153: 1813 - 1824

Van Parijs L, Refaeli Y, Lord JD, Nelson BH, Abbas AK, Baltimore D. *Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death.* Immunity 1999; 11: 281 - 288

Van Rood JJ, van Leeuwen A, van Santen MC. *Anti HL-A2 inhibitor in normal human serum.* Nature 1970; 226: 366 - 367

Walsh PT, Strom TB, Turka LA. *Routes to Transplant Tolerance versus Rejection: The Role of Cytokines.* Immunity 2004; 20: 121 - 131

Wang C, Sun J, Li L, Wang L, Dolan P, Sheil AG. *Conversion of pancreas allograft rejection to acceptance by liver transplantation.* Transplantation 1998; 65: 188 - 192

Wick MJ, Leithauser F, Reimann J. *The hepatic immune system.* Crit Rev Immunol 2002; 22: 47 - 103

Wissoczky N. *Ueber das Eosin als Reagens auf Hämoglobin und die Bildung von Blutgefäßen und Blutkörperchen bei Säugethier-und Hühnermembranen.* Arch Mikr Anat 1877; 13: 479 - 496

Wood KJ und Sakaguchi S. *Regulatory T cells in transplantation tolerance.* Nat Rev Immunol 2003; 3: 199 - 210

---

Zavazava N und Krönke M. *Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in allogeneic cytotoxic T Lymphocytes*. Nature Medicine 1996; 2: 1005 - 1010

Zhai Y, Shen XD, Lehmann M, Busuttil R, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW. *T cell subsets and in vitro immune regulation in "infectious" transplantation tolerance*. J Immunol 2001; 167: 4814 - 4820

Zimmermann FA, Butcher GW, Davies HS, Brons G, Kamada N, Turel O. *Techniques for orthotopic liver transplantation in the rat and some studies of the immunologic responses to fully allogeneic liver grafts*. Transplant Proc 1979; 11: 571 - 577

Zimmermann FA, Davies HS, Knoll PP, Gokel JM, Schmidt T. *Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the fate of the graft*. Transplantation 1984; 37: 406 - 410

---

## Verzeichnis der wichtigsten Abkürzungen

---

BN	Brown Norway-Ratte (Inzuchtstamm)
CD	Cluster of Differentiation; Unterscheidungsmerkmal der T-Zell-Subpopulationen
DA	Dark Agouti-Ratte (Inzuchtstamm)
dNTP-Gemisch	Äquimolare Mischung der vier Deoxynukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP
FACS	fluorescence activated cell sorter
GAPDH	Glyceraldehydat-3-Phosphat Dehydrogenase
H&E	Hämatoxilin-Eosin
IHL	Intrahepatische Leukozyten
IL	Interleukin
LEW	Lewis-Ratte (Inzuchtstamm)
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	Major histocompatibiliy complex
mM	Millimol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
PBS	phosphat bufferd saline
PCR	Polymerase chain reaction
pg	Pikogramm
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
p.op.	post operationem
Th1/2	T-Helferzelle 1/2
TCR	T cell receptor (T-Zellrezeptor)
TOL	Spontantoleranzgruppe
REJ	Rejektionsgruppe; Abstoßungsgruppe
SYN	Syngene Kontrollgruppe
U	Unit, Begriff aus der Enzymkinetik; Für die hier verwendete AmpliTaq Gold von Applied Biosystems ist 1 U definiert als die Enzymmenge, die 10 mMol dNTPs während einer 10 minütigen Inkubationsphase bei 74 °C in ein Template einbaut.
xg	Vielfaches der Erdanziehungskraft

---

## Danksagung

---

Herrn **Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede**, Ärztlicher Direktor des Zentrums Operative Medizin und Direktor der Chirurgischen Klinik I der Universität Würzburg, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Bereich der chirurgischen Forschung.

Herrn **Prof. Dr. med. H.-J. Gassel**, Chefarzt der Chirurgischen Klinik des Krankenhauses Mülheim an der Ruhr und ehemaliger stellvertretender Direktor der Chirurgischen Klinik I der Universität Würzburg, danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn **PD Dr. rer. nat. C. Otto**, Arbeitsgruppe für experimentelle Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, danke ich für die detaillierte Projektplanung und seine unermüdliche Hilfestellung bei der Durchführung des Versuchsvorhabens, vor Allem aber für seine fast endlose Geduld, sowohl bei den Experimenten selbst, als auch bei der Erstellung dieser Arbeit.

Frau **Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs**, Leiterin der Arbeitsgruppe für experimentelle Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, danke ich für die Unterstützung im Rahmen der Arbeitsgruppe.

Herrn **Dr. med. U. Steger**, Assistenzarzt der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, und Frau **J. Grimmer**, Medizinisch-Technische Assistentin, danke ich für die Hilfe bei der Durchführung Transplantationen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Frau **N. Martens**, Medizinisch-Technische Assistentin, danke ich für ihre Unterstützung beim Erlernen der vielfältigen immunologischen Techniken und ihre Mithilfe bei wichtigen Experimentalserien.

---

# LEBENS LAUF

JENS KAUCZOK

Keesburgstraße 34b

97074 Würzburg

Tel: 0931-2075129

jens@kauczok.de

## PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum/-ort: 29. Mai 1974 in Schweinfurt  
Familienstand: Verheiratet  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

## BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Seit Juli 2003 Wissenschaftlicher Assistent an der Chirurgischen Klinik I der Universität Würzburg  
(Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede).  
Januar 2002 bis Juni 2003 Arzt im Praktikum an der Chirurgischen Klinik I der Universität Würzburg



## AUSBILDUNG

Nov 1994 – Okt 2001 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Okt 2001 **3. Medizinisches Staatsexamen**  
Aug 2000 **2. Medizinisches Staatsexamen**  
Aug 99 – April 2000 Freisemester mit Durchführung aller Tierversuche für die Dissertation  
Aug 1998 **1. Medizinisches Staatsexamen**  
Aug 1996 **Ärztliche Vorprüfung**  
Aug 1993 – Okt 1994 Zivildienst im Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt, Abteilung für Neurochirurgie, Pflegedienst  
Juli 1993 **Abitur**  
1984 – 1993 Celtis-Gymnasium Schweinfurt, humanistisch-neusprachlicher Zweig  
1980 – 1984 Auen- Grundschule Schweinfurt

Würzburg, den 21. Oktober 2005

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jens Kauczok'. The signature is fluid and cursive, written over a light background.

Jens Kauczok