

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Chirurgische Klinik I

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

**Untersuchungen zur Interaktion zwischen
T-Lymphozyten und Makrophagen bei der Abstoßung
allogener Nebenschilddrüsentransplantate**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Michael Ulbrich

aus Murnau

Würzburg, Oktober 2006

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Otto
Korreferent: Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2007

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern
und meiner Frau Kristin
in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Fragestellung	7
3 Material und Methoden	8
3.1 Versuchstiere	8
3.2 Kulturmedium und Pufferlösungen.....	8
3.3 Bestimmung des Serumkalziums.....	9
3.4 Versuchsablauf und Gruppeneinteilung.....	9
3.5 Mikrochirurgische Operationstechnik.....	12
3.6 Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1	14
3.7 Durchflußzytometrie	15
3.8 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	15
3.9 Histologische Untersuchungen	17
3.10 Fotodokumentation.....	18
3.11 Auswertung	19
4 Ergebnisse	20
4.1 Durchflußzytometrische und immunhistologische Untersuchung frisch explantierter Nebenschilddrüsen.....	20
4.2 Auswirkung von Parathyreoidektomie und Nebenschilddrüsentransplantation auf die Kalziumhomöostase	24
4.3 Untersuchungen zur Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate in nicht-sensibilisierten Tieren.....	25
4.3.1 Bestimmung von Transplantatfunktionszeiten	25
4.3.2 Dynamik der zellulären Transplantatinfiltation	27
4.3.3 Molekularbiologische Analysen Transplantat-infiltrierender Makrophagen	38
4.4 Untersuchungen zur Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate in sensibilisierten Tieren.....	41
4.4.1 Bestimmung von Transplantatfunktionszeiten	41
4.4.2 Beschleunigte Transplantatabstoßung: Dynamik der zellulären Infiltration.....	44
4.4.3 Molekularbiologische Analysen Transplantat-infiltrierender Makrophagen	48
5 Beantwortung der Fragen	50
6 Diskussion	52
6.1 Aktueller Stand der allogenen Nebenschilddrüsentransplantation.....	52
6.2 Verlauf der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate	56
7 Ausblick	64
8 Zusammenfassung	65
9 Anhang	68
10 Literaturverzeichnis	77
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungen

ADCC:	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
APC:	antigen presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle)
CsA:	Cyclosporin A
EK:	Epithelkörperchen
FACS:	Fluorescence activated cell sorter (durchflußzytometrische Zellanalyse)
IL-2R:	Interleukin-2-Rezeptor (CD25)
iNOS:	induzierbare NO-Synthase
IFN- γ :	Gamma-Interferon
KG:	Körpergewicht
LEW:	Lewis-Ratte
mAk:	monoklonaler Antikörper
Min:	Minute
MHC:	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NO:	Stickstoffmonoxid
NSD:	Nebenschilddrüse
PBS:	phosphate buffered saline (Puffermedium)
TCR:	T cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TNF- α :	Tumor-Nekrosefaktor- α
Tx:	Transplantation
U/Min:	Umdrehungen pro Minute
WF:	Wistar-Furth-Ratte

1 Einleitung

Erstmals vor 100 Jahren wurden Fälle von tödlich verlaufender Tetanie nach Schilddrüsenoperationen beschrieben (Erdheim, 1906). Als Ursache wurde ein Mangel des Peptidhormons Parathormon (PTH) festgestellt, weshalb diese Erkrankung als Hypoparathyreoidismus bezeichnet wurde. Das von den Nebenschilddrüsen abgegebene Parathormon reguliert den Kalziumspiegel im Blut, indem es die Kalziumausscheidung durch die Nieren verringert und die Kalziumresorption aus Knochen und Darm verstärkt (Abb. 1.1). Fehlt das für die Kalziumhomöostase wichtige Parathormon, so sinkt der Kalziumspiegel ab und tetanische Krämpfe, Organverkalkungen (Nephrokalzinose, Katarakt) sowie psychische Erkrankungen (Psychosen, Depressionen) können die Folge sein (Parfitt, 1979).

Die häufigste Ursache des Hypoparathyreoidismus sind Operationen im Halsbereich, wobei das Risiko, an einem Hypoparathyreoidismus zu erkranken, zwischen 0,5% und 4% liegt (Arlt et al., 2002). Bei circa 100.000 jährlich in Deutschland durchgeführten Schilddrüsenoperationen (Zahlen des Statistischen Bundesamtes) kommen somit schätzungsweise 500-4000 neue Fälle an Hypoparathyreoidismus hinzu. Seltener handelt es sich beim Hypoparathyreoidismus um einen angeborenen Defekt bzw. um die Zerstörung der Nebenschilddrüsen durch Bestrahlungen oder Entzündungen (Parfitt, 1979; Garfield und Karaplis, 2001). Auch Autoimmunerkrankungen können Ursache für einen Hypoparathyreoidismus sein.

Seit 1930 besteht die Standardtherapie zur Behandlung des Hypoparathyreoidismus aus Kalzium und Vitamin D-Analoga. Diese Therapie erhöht zwar den Kalziumspiegel im Blut durch eine gesteigerte intestinale Kalziumresorption, korrigiert aber nicht den Kalziumverlust durch die Nieren, was zur chronischen Hyperkalzurie und schließlich zur Niereninsuffizienz führt (Winer et al., 2003). Doch beeinflusst die Standardtherapie aus Kalzium- und Vitamin D-Gaben die psychischen Symptome kaum (Arlt et al., 2002).

Eine Alternative zur Standardtherapie stellt die Hormonsubstitution dar, wie sie auch bei anderen Hormonmangel-Erkrankungen wie Nebenniereninsuffizienz, Schilddrüseninsuffizienz und Diabetes mellitus eingesetzt wird. Die Hormonsubstitution zur Behandlung des Hypoparathyreoidismus befindet sich jedoch noch im experimentellen Stadium. So wurden bei ersten Versuchen mit bovinem Parathormon Resistenzen bei den behandelten Patienten beobachtet (Melick et al., 1967). Die tägliche Applikation von rekombinant hergestelltem humanen Parathormon löste eine Osteosarkombildung im Tier aus (Vahle et al., 2002). Zwar verhindern die täglichen Hormongaben die akuten Symptome der Erkrankung, nicht jedoch die Spätschäden wie Katarakt und Organverkalkungen.

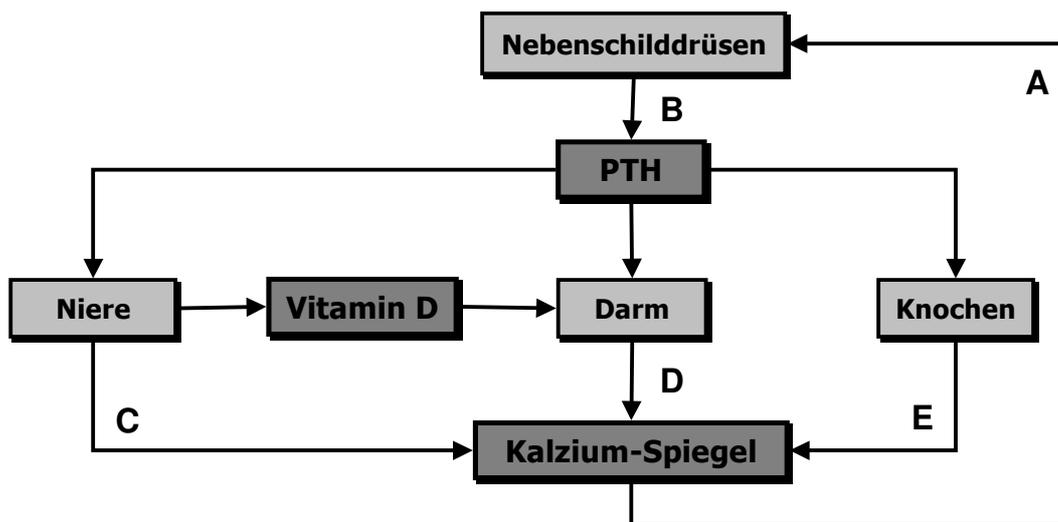


Abb. 1.1: Die Regulation des physiologischen Kalziumspiegels. Der Kalziumspiegel im Blut wird durch die Hauptzellen der Nebenschilddrüsen gemessen (A). Je geringer der Kalziumspiegel, desto mehr Parathormon (PTH) wird sezerniert und umgekehrt (B). PTH hat drei wichtige Zielorgane: Niere, Darm und Knochen. In der Niere führt PTH zu einer gesteigerten Kalziumrückresorption am distalen Tubulus und damit zur Verminderung der Kalziumausscheidung im Urin (C). Weiterhin stimuliert PTH die Umwandlung von 25-Hydroxycholecalciferol in die aktive Form 1,25-Hydroxycholecalciferol (Vitamin D). Vitamin D wirkt ebenso wie PTH selbst auf die Dünndarmmucosazellen und stimuliert die Resorption von Kalzium und Magnesium aus dem Darm (D). Im Knochen aktiviert PTH die Osteoklasten, so dass Kalzium durch Knochenabbau freigesetzt wird (E). Modifiziert nach Henne-Bruns (Henne-Bruns et al., 2001).

Ein Sonderfall der Hormonsubstitution stellt die Transplantation dar. Durch die Übertragung von Nebenschilddrüsengewebe wird die tagesrhythmische Parathormonsekretion im Patienten wiederhergestellt und Spätschäden vermieden. Dass Nebenschilddrüsentransplantationen eine wirkungsvolle Therapie für den Hypoparathyreoidismus darstellen, belegen die langjährigen Erfahrungen mit der Autotransplantation. Hierzu werden bei Schilddrüsenoperationen Teile der mit entnommenen Nebenschilddrüsen in die Unterarmmuskulatur übertragen (Olson et al., 1996). Bei der Autotransplantation sind Transplantat und Empfänger genetisch identisch (Segeberg et al., 1992), während bei der allogenen Transplantation Transplantat und Empfänger genetisch verschieden sind. Dies führt dazu, dass das Transplantat ohne den Einsatz von Immunsuppressiva abgestoßen wird.

Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation befindet sich bis heute im experimentellen Stadium, da bisher keine klinisch relevanten Lösungsansätze für die notwendige nebenwirkungsreiche Immunsuppression gefunden wurden. Im Gegensatz zu den großen Organtransplantaten wie Leber, Niere oder Herz ist beim Hypoparathyreoidismus der dauerhafte Einsatz von Immunsuppressiva nicht gerechtfertigt. Da unter konventioneller Therapie mit Kalzium und Vitamin D der Hypoparathyreoidismus nicht lebensbedrohlich ist, sind die durch Immunsuppressiva verursachten Nebenwirkungen wie septische Infektionen und eine erhöhte Inzidenz von Malignomen bei dieser Erkrankung nicht zu akzeptieren (Berchtold und Seitz, 1996; Dunn, 2001). Somit sind neue Strategien notwendig, um die Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate ohne Nebenwirkungen zu verhindern. Die Immunantwort des Empfängers gegenüber allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten wurde bisher wenig charakterisiert.

Transplantationsexperimente belegen, dass ohne alloreaktive CD4⁺ T-Lymphozyten eine Abstoßung in der Regel nicht möglich ist (Bishop et al., 1992; Dalloul et al., 1996). Dabei werden die alloreaktiven T-Lymphozyten von Alloantigenen aktiviert, die von Zellen des Transplantates und den im Transplantat befindlichen „passenger leukocytes“ (oder Spenderleukozyten) exprimiert werden.

Zwei unterschiedliche Wege der T-Zellaktivierung nach Transplantation werden unterschieden: Erkennen CD4+ T-Lymphozyten des Transplantatempfängers allogene MHC-Klasse-I und Klasse-II-Moleküle auf der Zelloberfläche von „passenger leukocytes“, so wird vom direkten Weg der Alloantigenerkennung gesprochen (Abb. 1.2). Innerhalb der Spenderleukozyten werden in erster Linie die antigenpräsentierenden Zellen von Bedeutung sein, da sie auch die zur T-Zellaktivierung notwendigen kostimulatorischen Moleküle exprimieren (Haspot et al., 2002). Auch alloreaktive CD8+ T-Lymphozyten werden über diesen Weg aktiviert, indem sie allogene MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche solcher Spenderleukozyten direkt erkennen. Diese Form der Antigenenerkennung wird damit erklärt, dass die T-Zellrezeptoren bestimmter T-Zellsubfamilien eine Kreuzreaktivität für allogene MHC-Moleküle aufweisen (Lechler et al., 1990; Lombardi et al., 1990). Dabei ist mit ca. 1-10% der Anteil der alloreaktiven T-Lymphozyten ungewöhnlich hoch. Da bereits kurze Zeit nach Transplantation die Spenderleukozyten nahezu vollständig zerstört sind, verliert dieser Weg der T-Zellaktivierung rasch an Bedeutung. Zwar führt die Depletion der Spenderleukozyten vor Transplantation zu einer deutlichen Verlängerung der Transplantatfunktion, doch ist diese begrenzt (Lafferty et al., 1975; Sekine et al., 1997).

Der indirekte Weg der Alloantigenerkennung stellt eine weitere Möglichkeit dar, allogene T-Lymphozyten nach Transplantation zu aktivieren (Lechler und Batchelor, 1982). Dabei nehmen antigenpräsentierende Zellen des Empfängers allogene Proteine über Endozytose auf und zerlegen sie in Bruchstücke, die anschließend über Selbst-MHC-Klasse-II-Moleküle den eigenen T-Lymphozyten präsentiert werden. Auch die allogenen MHC-Moleküle werden auf diese Art in Peptide gespalten und -- gebunden an Selbst-MHC-Klasse-II-Moleküle -- an die Zelloberfläche transportiert (Abb. 1.2). Solche Peptide, die sich auch synthetisch herstellen lassen, sensibilisieren den Transplantatempfänger und führen zu einer beschleunigten Transplantatabstoßung. Grundlage hierfür ist das „immunologische Gedächtnis“ oder der „Memory-Effekt“ der alloreaktiven T-Lymphozyten.

Das von unserer Arbeitsgruppe verwendete alloreaktive Peptid P1, das mit einem bestimmten Bereich des MHC-Klasse-I-Rezeptors der WF-Ratte identisch ist, löst eine starke T-Zellantwort in Lewis-Ratten aus. Zudem werden in P1-immunisierten Lewis-Ratten vaskularisierte Organtransplantate aus Wistar-Furth-Ratten beschleunigt abgestoßen (Sitaru et al., 2002 und 2004).

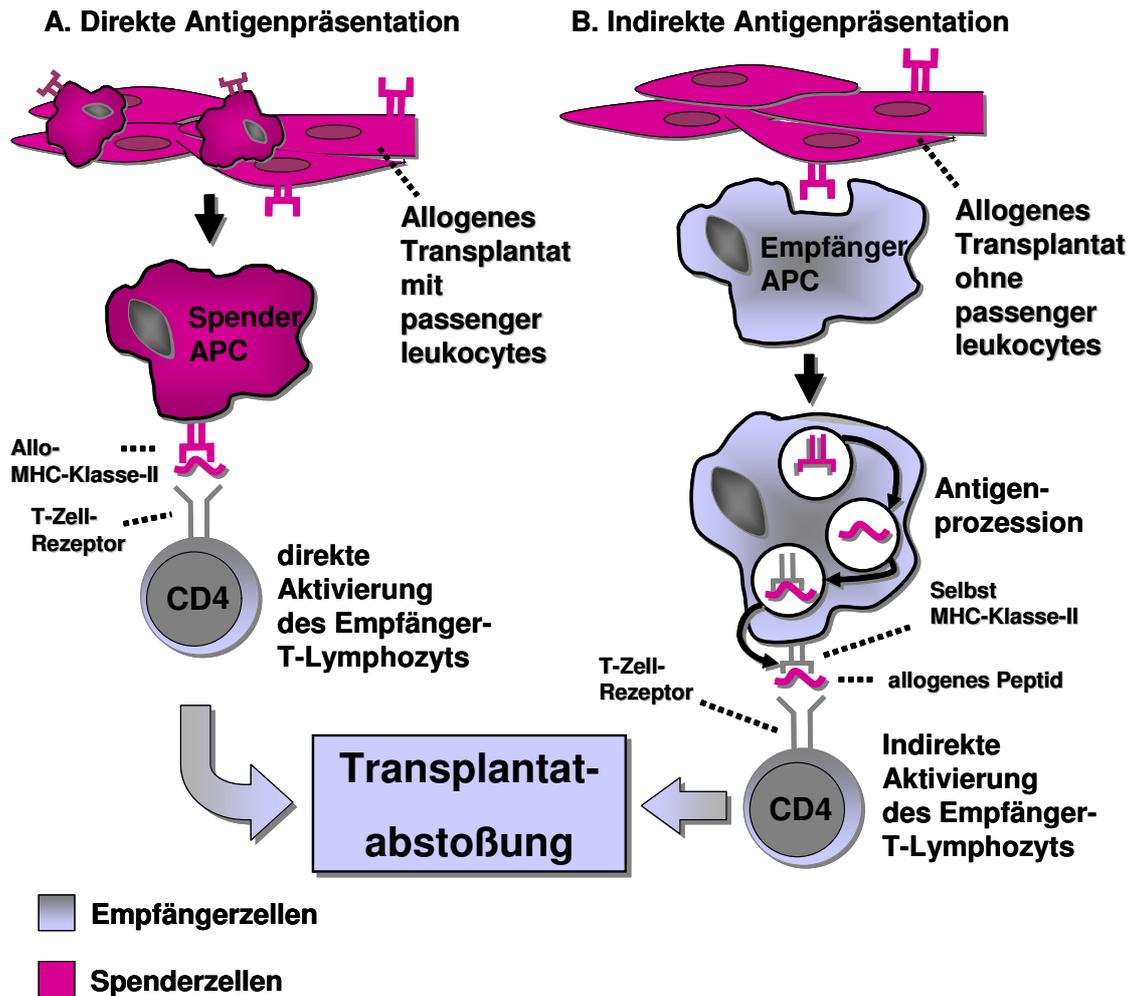


Abb. 1.2: Die beiden Wege zur Aktivierung alloreaktiver CD4+ T-Lymphozyten nach allogener Transplantation. Bei der direkten Alloantigenerkennung (A) erkennen empfangereigene CD4+ T-Lymphozyten allogene MHC-Klasse-II-Moleküle (Allo-MHC-Klasse-II) auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC), die mit dem Organ übertragen werden. Bei der indirekten Alloantigenerkennung (B) erkennen empfangereigene CD4+ T-Lymphozyten allogene Peptide in Selbst-MHC-Klasse-II Molekülen. Diese Peptide werden durch empfangereigene antigenpräsentierende Zellen aus allogenem MHC-Klasse-II-Molekülen prozessiert und anschließend den eigenen CD4+ T-Lymphozyten präsentiert.

Die über den direkten oder indirekten Weg der Alloantigenerkennung aktivierten CD4+ T-Helfer-Lymphozyten (Abb. 1.2) rekrutieren und aktivieren weitere Effektorzellen, die an der Transplantatzerstörung unmittelbar beteiligt sind. Hierzu gehören CD8+ T-Lymphozyten, Natürliche Killer (NK)-Zellen, Granulozyten und Makrophagen (Le Moine et al., 2002; Rocha et al., 2003).

Es häufen sich die Hinweise, dass Makrophagen bei zahlreichen physiologischen Vorgängen eine komplexere Rolle spielen als bisher angenommen. So sind sie beispielsweise an der Wundheilung, Angiogenese und Entfernung von nekrotischem Gewebe beteiligt. Weiterhin können sie T-Lymphozyten rekrutieren und aktivieren sowie Antigene präsentieren (Stoy, 2001). Sie sind bekannte Effektorzellen bei Autoimmunerkrankungen und können körpereigene Zellen abtöten (Schwizer et al., 1984; Appels et al., 1989). So wurde in einem Experimentalmodell zur multiplen Sklerose beobachtet, dass die Depletion der Makrophagen die Gewebedestruktion verhindert, obwohl ein Infiltrat aus T-Lymphozyten weiterhin vorhanden ist (Huitinga et al., 1995). Auch bei der Transplantat-abstoßung scheinen Makrophagen eine wichtige Rolle zu spielen. So konnten Makrophagen als zytotoxische Effektorzellen in allogenen Transplantationsmodellen nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1998; Slegers et al., 2000; Jose et al., 2003).

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, die Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate im Kleintiermodell Ratte immunhistologisch und molekularbiologisch näher zu charakterisieren. Hierzu wurde ihre Infiltration durch immunkompetente Empfängerzellen untersucht. Dabei wurden insbesondere T-Lymphozyten und Makrophagen näher betrachtet, da diesen beiden Zellgruppen bei der Abstoßung vaskularisierter Organtransplantate eine besondere Bedeutung zukommt (Alexander et al., 1996).

2 Fragestellung

Um die Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate näher zu charakterisieren, sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Auswirkungen haben die Parathyreoidektomie und die heterotope Transplantation von Nebenschilddrüsen auf die Regulation des Kalziumspiegels?
2. Welche zellulären Veränderungen zeigen sich im und um das Transplantat nach allogener und syngener Transplantation von Nebenschilddrüsen?
3. T-Lymphozyten und Makrophagen sind wichtige Effektorzellen bei der Abstoßung vaskularisierter Organtransplantate. Sind diese Immunzellen auch an der Zerstörung primär nicht-vaskularisierter Nebenschilddrüsentransplantate beteiligt?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Transplantatempfänger wurden zehn bis zwölf Wochen alte und circa 200-250 g schwere Lewis-Ratten (LEW, RT1^l) verwendet. Als Spender der Organtransplantate dienten 14-16 Wochen alte und circa 250-300 g schwere Wistar-Furth-Ratten (WF, RT1^u). Es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Beide Inzucht-Rattenstämme wurden über Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Zur Ernährung erhielten die Tiere Pressfutter (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum.

3.2 Kulturmedium und Pufferlösungen

Kulturmedium

Das Kulturmedium RPMI 1640 enthielt folgende Zusätze (alle Angaben als Endkonzentration): 1 mmol/l Natrium-Pyruvat, 2 mmol/l L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µmol/l 2-Mercaptoethanol, 1% nicht-essentielle Aminosäuren und 10 % fetales Kälberserum (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland).

Lysepuffer

Zur Lyse von Erythrozyten wurde folgender Puffer verwendet: 1,6 mol/l Ammoniumchlorid, 99,88 mmol/l Kaliumhydrogencarbonat und 12,6 mmol/l EDTA. Dieser 10-fach konzentrierte Puffer wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 mit sterilem Aqua dest. verdünnt.

PBS (Phosphate buffered saline)

Der PBS-Puffer enthielt 140 mmol/l Natriumchlorid, 2,7 mmol/l Kaliumchlorid, 7,2 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat, 1,47 mmol/l Kaliumhydrogenphosphat und wurde auf pH 7,2 eingestellt.

Tris-Puffer mit Serumalbumin

Der Tris-Puffer enthielt 3,8 mmol/l Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 136,6 mmol/l NaCl (Merck). Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 wurden 50 mg/l bovines Serumalbumin (Sigma, München, Deutschland) zugegeben.

3.3 Bestimmung des Serumkalziums

Zur Bestimmung des Serumkalziums wurde den Ratten 0,3-0,5 ml Blut aus dem retrobulbären Venenplexus oder der Schwanzvene entnommen. Nach Zentrifugation wurde das Serumkalzium mit einem Cobas[®] Integra-Gerät (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland) mit der o-Kresolftalein-Komplexon-Methode bestimmt (Schwarzenbach, 1955). In Voruntersuchungen wurde der physiologische Serumkalziumbereich der Lewis-Ratte zwischen 2,0-2,7 mmol/l bestimmt. Im Mittel lag der Wert bei $2,5 \pm 0,2$ mmol/l. Hierzu wurden 62 verschiedene Blutproben untersucht.

3.4 Versuchsablauf und Gruppeneinteilung

Im Gegensatz zum Menschen mit seinen vier Nebenschilddrüsen haben Ratten nur zwei Glandulae parathyroideae, die sich bei einer Größe von ca. 0,6-0,8 mm gut gegenüber der Schilddrüse abgrenzen lassen (Abb. 3.1). Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 3.2 dargestellt. Nach Entfernung der Nebenschilddrüsen (Parathyreoidektomie) wurde der Serumkalziumspiegel der Tiere regelmäßig kontrolliert. Vollständig parathyreoidektomierte Tiere wiesen bei normaler Ernährung dauerhaft einen Serumkalziumspiegel unter 1,9 mmol/l auf. Es ist bekannt, dass bei Ratten zehn Tage nach Parathyreoidektomie eine Kompensation der Hypokalzämie einsetzt, so dass der Kalziumspiegel für mindestens zwei Wochen regelmäßig untersucht wurde (Waynforth und Flecknell, 1992). Die stabil hypokalzämischen Lewis-Ratten erhielten WF-Nebenschilddrüsen. Die Transplantation war erfolgreich, wenn der Kalziumanstieg wieder auf über 2,0 mmol/l anstieg. Da vier bis fünf Tage nach Transplantation der physiologische Kalziumspiegel wiederhergestellt war, wurde über diesen Parameter das Transplantatüberleben überwacht. Routinemäßig fand die Blutent-

nahme am Tag 7 nach Transplantation statt. Es folgten weitere regelmäßige Blutentnahmen, um den Zeitpunkt der Transplantatabstoßung zu ermitteln (Tabelle 3.1). Zu festgelegten Zeitpunkten oder bei Abfall des Serumkalziums unter 2,0 mmol/l als Zeichen der Abstoßung, wurden die Transplantate entnommen und immunhistologisch sowie molekularbiologisch untersucht.

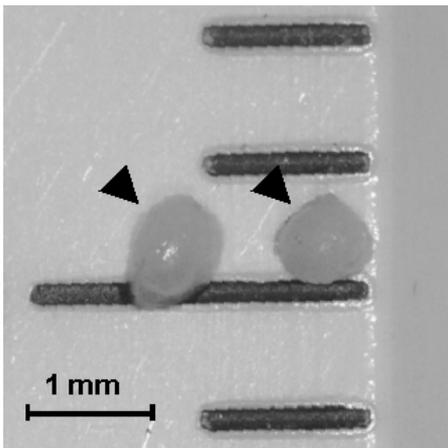


Abb. 3.1: Darstellung zweier frisch explantierter WF-Epithelkörperchen (Pfeile). Trotz ihrer geringen Größe von 0,6 bis 0,8 Millimeter lassen sie sich mit einiger Übung mikrochirurgisch gut explantieren und unter die Nierenkapsel transplantieren (Abb. 3.4). Ihre Ernährung wird bis zur Revaskularisierung, die bereits nach wenigen Tagen eintritt, durch Diffusion sichergestellt (Vergrößerung x24).

Tabelle 3.1: Gruppeneinteilung zur Bestimmung von Transplantatüberlebenszeiten.

Gruppe	Anzahl der Tiere
Syngene Transplantation (Kontrollgruppe)	4
Allogene Transplantation	5
Allogene Transplantation nach vorheriger Immunisierung mit P1 (s. Kap. 3.6)	5

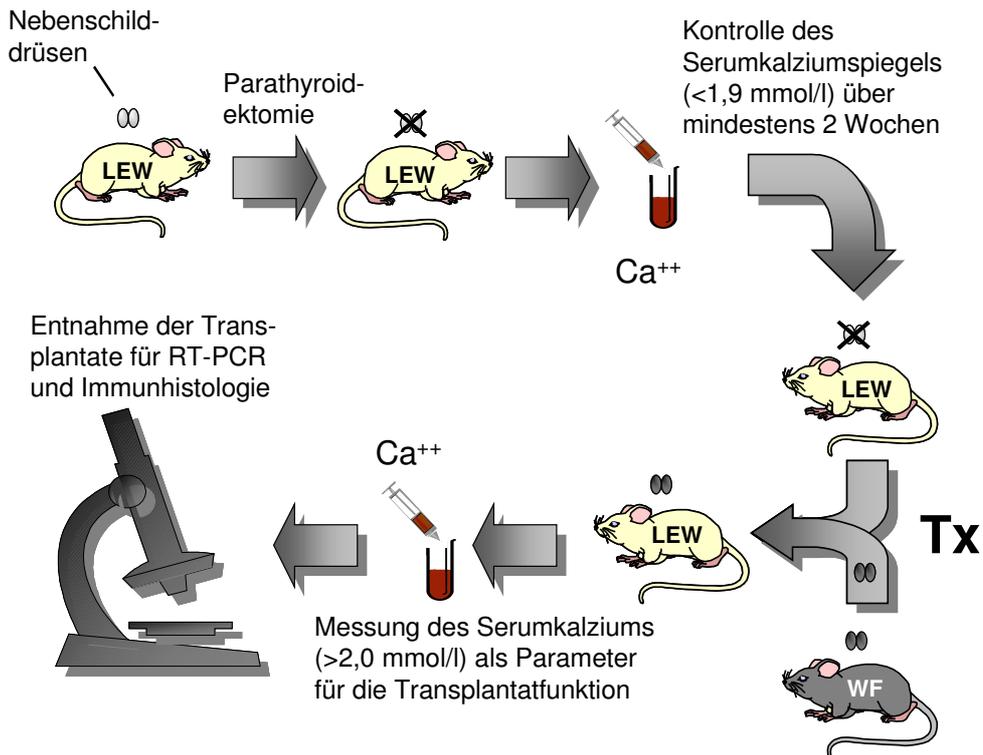


Abb. 3.2: Darstellung der heterotopen Nebenschilddrüsentransplantation. Lewis-Ratten wurden die Nebenschilddrüsen entnommen (Parathyroidektomie) und der Serumkalziumspiegel für mindestens zwei Wochen kontrolliert. Bei einem stabilen Kalziumwert unter 1,9 mmol/l waren die Tiere vollständig parathyroidektomiert, danach erhielten sie entweder syngene oder allogene Nebenschilddrüsentransplantate. Daraufhin stieg der Kalziumwert über 2,0 mmol/l an (s. Abb. 4.3). Es folgten Blutabnahmen in kurzen Zeitabständen. Beim Absinken des Kalziumwerts unter 2,0 mmol/l, als Zeichen der Abstoßung, oder zu definierten Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und die Organe explantiert und untersucht (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Gruppeneinteilung zur immunhistochemischen Analyse der Abstoßung.

Gruppe	Organentnahme ^{*)}	Anzahl der Tiere
Syngen (LEW-LEW) ^{**)}	2, 4, 7, 11, 15, 20, 30, 70, 106	9
Allogen (WF-LEW)	1, 2, 2, 3, 4, 4, 5, 6, 7, 7, 9, 11, 11, 13, 15, 15, 16, 20, 20, 30, 30	21
Allogen (WF-LEW) nach vorheriger Immunisierung mit P1	2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 13, 15	9

^{*)} Zeitpunkt der Organentnahme nach Transplantation in Tagen

^{**)} (LEW-LEW) oder (WF-LEW) = (Transplantatspender-Transplantatempfänger)

3.5 Mikrochirurgische Operationstechnik

Sowohl zur Explantation als auch zur Transplantation der Nebenschilddrüsen wurde ein Operationsmikroskop (Typ 384000, Fa. Wild, Heerbrugg, Schweiz) mit 10- bis 40-facher Vergrößerung verwendet. Die Anästhesie der Tiere erfolgte durch Inhalationsnarkose mit 3-5% Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland; Vapor: Dräger, Lübeck, Deutschland). Nach Transplantation wurde mit Prolene[®] 8-0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) das Nierenkapselgewebe und mit Prolene[®] 4-0 Muskel und Haut verschlossen. Danach wurde Nobecutan[®] Spray (Astra Chemicals GmbH, Wedel, Deutschland) als Wundsprühverband aufgetragen. Postoperativ wurde den Tieren 0,25 ml Tramal[®] (0,5 mg/ml, Grünenthal, Stolberg, Deutschland) zur Analgesie subcutan verabreicht. Den tief narkotisierten Spendertieren wurde nach Explantation der Nebenschilddrüsen T61[®] (Hoechst Veterinär GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) intrakardial injiziert. Fünf Minuten nach der tödlichen Injektion wurde die Isofluran-Narkose abgeschaltet.

Explantation der Nebenschilddrüsen

Den narkotisierten Tieren wurden die Haare im Halsbereich entfernt und eine mittige zervikale Hautinzision vorgenommen. Die großen Speicheldrüsen und Lymphknoten wurden zur Seite gedrängt und die infrahyale Muskulatur freigelegt. Danach wurden die Musculi sternohyoideus und sternothyroideus in der Mitte gespalten und gegebenenfalls von der Schilddrüse abpräpariert. Nun konnten die paarigen Nebenschilddrüsen in anterolateraler Position identifiziert (Abb. 3.3) und mit wenig Schilddrüsengewebe entfernt werden. Dabei wurde darauf geachtet, sowohl dem Gewebe, als auch den Transplantaten so wenig Schaden wie möglich zuzufügen. Nach ausreichender Blutstillung wurden Muskeln, Speicheldrüsen und Lymphknoten wieder in ihre ursprüngliche Position gebracht, und die Haut mit 4-0 Prolene[®] fortlaufend genäht. Die Tiere wurden jeden Tag auf Komplikationen (Infektion, Nachblutung, Wundheilungsstörungen) untersucht und gewogen.

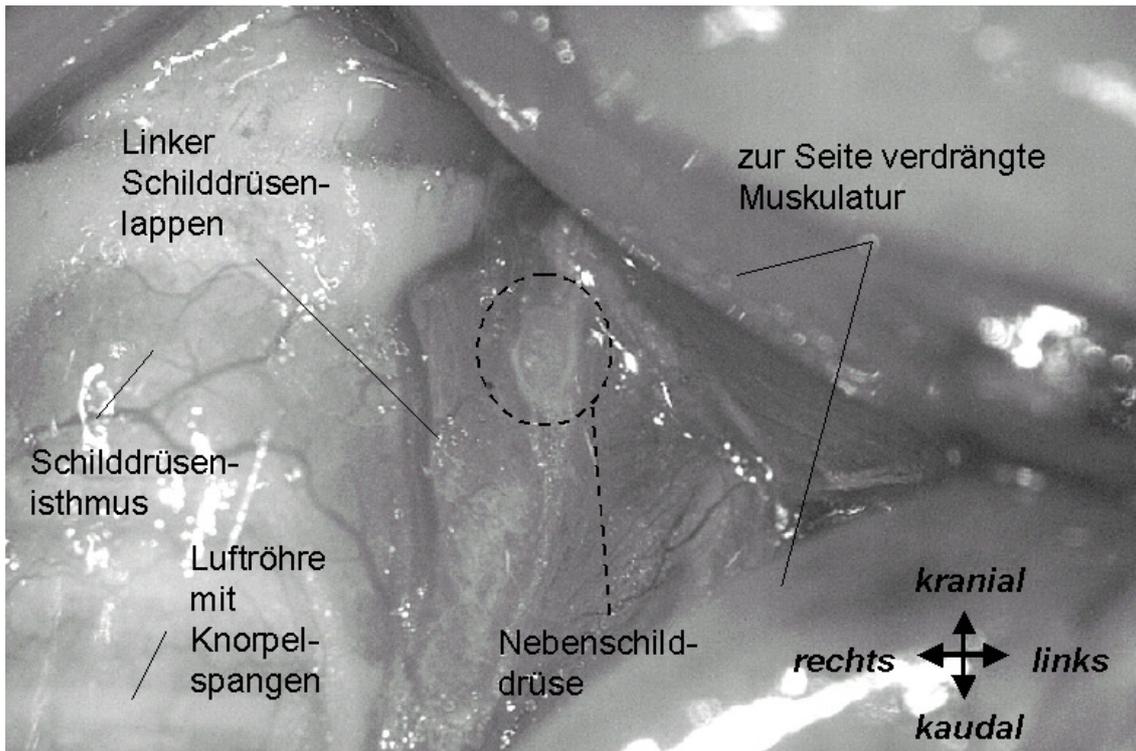


Abb. 3.3: Operationssitus vor Explantation des linken Epithelkörperchens (gestrichelter Kreis). Muskeln und Speicheldrüsen sind zur Seite verdrängt (Vergrößerung x16).

Heterotope Transplantation der Nebenschilddrüsen

Parathyreoidektomierte und stabil hypokalzämische LEW-Ratten wurden an der linken lateralen Bauchwand rasiert und in Rechtsseitenlage positioniert. Durch einen linksseitigen Flankenschnitt wurde die linke Niere freigelegt. Mit einem Venenkatheter (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) wurde die Nierenkapsel inzidiert und ohne Verletzung des Nierenparenchyms mit dem Kunststoffkatheter ein etwa 1 cm² großer Bereich unterminiert, in dem die Nebenschilddrüsen abgelegt wurden (Abb. 3.4). In regelmäßigen Zeitabständen wurde der Operationssitus mit isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius AG) befeuchtet. Nach Entfernen des Kunststoffkatheters wurde die Nierenkapsel mikrochirurgisch mit Prolene® 8-0 in Einzelknopftechnik verschlossen, um einen Austritt der Nebenschilddrüsen in die freie Bauchhöhle zu verhindern. Der Wundverschluss von Muskel und Haut erfolgte mit Prolene® 4-0.

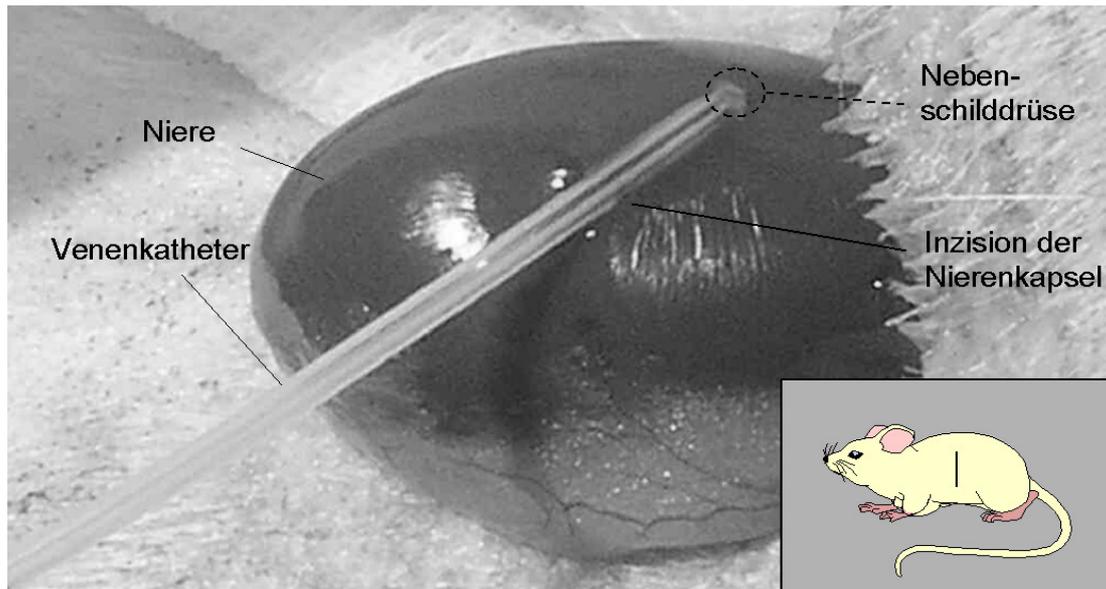


Abb. 3.4: Implantation einer Nebenschilddrüse. Die Nebenschilddrüse (siehe Kreis) wird mittels eines Venenkatheters (Fa. B. Braun AG) unter die Nierenkapsel gesetzt. Die Niere wurde zuvor durch einen lateralen Flankenschnitt (Linie im Inset) freigelegt (Vergrößerung x16).

Explantation der transplantierten Nebenschilddrüsen

Zu definierten postoperativen Zeitpunkten (Tabelle 3.2) wurden die unter die Nierenkapsel transplantierten Nebenschilddrüsen explantiert. Jeweils eine der beiden Nebenschilddrüsen wurde in Trizol (Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zur Isolierung von mRNA homogenisiert. Die andere Nebenschilddrüse wurde in Tissue-Tek (Sakura, Torrance, USA) eingebettet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung für die Immunhistologie aufbewahrt.

3.6 Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1

Das synthetische Peptid P1 wurde in einer Reinheit von 95% eingesetzt (Jerini AG, Berlin, Deutschland). Es ist mit einer der β -Faltblattstrukturen des extrazellulären Bereichs des MHC-Klasse-I-Moleküls der WF-Ratte identisch und löst eine starke, zur Transplantatabstoßung führende Immunantwort aus (Sitaru et al., 2002). Zur Immunisierung wurden 12,5 μ l der Peptid-Lösung (1 mg/ml) mit 12,5 μ l Adjuvans (TiterMax, Alexis GmbH, Grünberg, Deutschland) im Zylinder

einer Insulin-Einmalspritze (Omnican, B.Braun AG) auf einem Vortexer gemischt. Sieben Tage vor der geplanten Transplantation wurden den parathyreoidektomierten LEW-Ratten die Peptid-Lösung subkutan in die Sohlen ihrer Hinterfüße injiziert (12,5 µl pro Fuß). Hierzu wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert.

3.7 Durchflußzytometrie

Sechs frisch explantierte Nebenschilddrüsen wurden durch ein Zellsieb (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) mit 70 µm Porengröße gepresst und mit Kulturmedium gewaschen. Jeweils 50 µl dieser Zellsuspension (ca. 5×10^5 Zellen) wurden mit 5 µl eines monoklonalen Antikörpers für 5 Minuten im Eisbad (4 °C) inkubiert. Die Maus-anti-Ratte Antikörper waren entweder mit Fluoresceinisothiozyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) konjugiert: Ox18PE (anti-RT1.A, MHC-Klasse-I-Rezeptor), Ox6PE (anti-RT1.B, MHC-Klasse-II-Rezeptor) und Ox1F (anti-CD45) (Tabelle 3.4). Tote Zellen wurden mit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD, Becton Dickinson, Mountain View, USA) angefärbt, um sie von der Untersuchung auszuschließen. Als Positivkontrolle diente der Ox18PE Antikörper, während konjugierte Antikörper des gleichen Isotyps (Isotypenkontrollen, Becton Dickinson) als Negativkontrolle verwendet wurden. Nach der Inkubation mit den Antikörpern erfolgte die Analyse mit einem FACScan[®]-Gerät der Firma Becton Dickinson, wobei die Signalauswertung mit jeweils 10.000 Zellen erfolgte. Später wurden die Daten mit der Software WinMDI (Joseph Trotter, <http://facs.scripps.edu>) ausgewertet.

3.8 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Eine der explantierten Nebenschilddrüsen wurde in 500 µl Trizol mechanisch mit einem Ultra Turrax-Gerät (IKA Werk Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Danach wurden weitere 500 µl Trizol zugegeben und die RNA gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Die luftgetrocknete RNA wurde in 40 µl „RNA storage solution“ (1 mmol/l Natriumcitratlösung, Ambion, Austin,

USA) gelöst und bei -80° C aufbewahrt. Für die cDNA Synthese wurden 5 µl RNA mit MuLV Reverse Transkriptase (2,5 U/µl), Oligo d(T)₁₆ Primer (2,5 µmol/l) und dNTP Mix (jeweils 10 mmol/l) mit dem GeneAmp RNA PCR Kit (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Jeweils 5 µl cDNA wurden mit Primern (Tabelle 3.3) und AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems GmbH) in 35 Zyklen amplifiziert. Hierbei betrug das Reaktionsvolumen 50 µl. Die Oligonukleotidprimer wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Amplifikationsprodukte wurden in einem 2%igen Agarosegel (Amresco, Solon, USA) elektrophoretisch aufgetrennt. Die explantierten Nebenschilddrüsen wurden auf spezifische RNA für Parathormon, iNOS und die kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), und CD40 untersucht. Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) wurde als Positivkontrolle verwendet.

Tabelle 3.3: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer. Die PCR-Produkte wurden in 35 Zyklen amplifiziert.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Größe (Basenpaare)	Annealing-Temperatur [°C]
GAPDH ⁽¹⁾	forward GGT CGG TGT GAA CGG ATT TG	319	62
	reverse GTG AGC CCC AGC CTT CTC CAT		
iNOS ⁽²⁾	forward GAT CAA TAA CCT GAA GCC CG	578	60
	reverse GCC CTT TTT TGC TCC ATA AGG		
CD40 ⁽³⁾	forward CGC TAT GGG GCT GCT TGT TGA CAG	401	58
	reverse GAC GGT ATC AGT GGT CTC AGT GGC		
CD80 ⁽⁴⁾	forward TGG TGA AAC ACC TGA CCA	517	50
	reverse GTT TCT CTG CTT GCC TCA		
CD86 ⁽⁴⁾	forward TGG GAA ACA GAG CTC TCA	518	53
	reverse AGG TTG ATC GAC TCG TCA		
PTH ⁽⁵⁾	forward TAT GCG CTG GTG GAT GCG GA	539	52
	reverse AGG GAG GCG AGA GAC ATG GA		

⁽¹⁾ Kruse et al. 1999, ⁽²⁾ Sterin-Borda et al. 2003, ⁽³⁾ Matsui et al. 2002, ⁽⁴⁾ Giegerich et al. 1996,

⁽⁵⁾ Tucci et al. 1996

3.9 Histologische Untersuchungen

Anfertigen von Kryoschnitten

Hierzu wurden von den in Tissue-Tek eingebetteten Nebenschilddrüsen 5 µm dicke Schnitte mit einem Kryostaten (Frigocut 2800 N, Reichert-Jung, Leica, Wetzlar, Deutschland) bei -26 °C angefertigt und auf beschichtete Histobond® Objektträger (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen. Die Schnitte wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

HE (Hämatoxylin-Eosin) Histologie

Um die Morphologie der Organe zu beurteilen und einen Gesamteindruck der Zellinfiltration und Gewebereaktion zu bekommen, wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen nach Standardprotokoll (Wittekind, 2003) durchgeführt.

Immunhistologie

Nach Erwärmen von -80 °C auf -20 °C im Kryostaten wurden die Schnitte zur immunhistologischen Färbung in -20 °C kühlem Aceton für zehn Minuten fixiert. Nach zehnmütigem Trocknen wurden sie dreimal für jeweils fünf Minuten in Tris-Puffer gewaschen. Danach wurden 100 µl des mit Tris-Puffer verdünnten Primärantikörpers (Tabelle 3.4) pro Objektträger aufgetragen und in einer feuchten Kammer für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der mit Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper (ein rabbit-anti-mouse Antikörper der Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) 1:50 mit Tris-Puffer (versetzt mit 30% (Endkonzentration) Rattenserum) verdünnt und für 20 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang wurden die Schnitte mit Liquid DAB (3,3'-Diaminobenzidin) Pack (BioGenex, San Ramon, USA) entwickelt (Tabelle 3.4). Die mitlaufende Negativkontrolle wurde für fünf Minuten entwickelt. Danach erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun für fünfzehn Sekunden. Nach Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Inkubation in Xylol wurden die Gewebeschnitte mit Entellan eingedeckt (Merck, Deutschland).

Tabelle 3.4: Liste der verwendeten Antikörper.

Anti-körper	Epitop	detektierte Zellen	Bezugsadresse	Verdünnung	Entwicklungszeit mit DAB [Min]
Ox18	MHC-Klasse-I-Rezeptor	alle kernhaltigen Zellen	Linaris	1:100	1:00
Ox6	MHC-Klasse-II-Rezeptor	Antigenpräsentierende Zellen	Linaris	1:100	1:15
Ox1	CD45	alle hämatopoetischen Zellen	Linaris	1:10	-
ED1	CD68	Makrophagen	Linaris	1:100	1:15
ED2	CD163	Makrophagen, Monozyten	Linaris	1:50	2:30
Ox62	α -E2 Integrin	Dendritische Zellen	Serotec	1:50	4:30
1A29	CD54	Adhäsionsmolekül ICAM-1	Serotec	1:100	5:00
Ox33	CD45RA	B-Zellen	Linaris	1:50	5:00
R73	CD3	T-Zell-Rezeptor	Linaris	1:50	3:30
341	CD8	T-Zellen	Linaris	1:100	3:00
Ox39	CD25	IL-2-Rezeptor	Linaris	1:50	5:00
10/78	CD161	NK-Zellen	Serotec	1:100	4:30

Zytospins

Die am Tag 3 (n=2) und Tag 7 (n=2) explantierten Nebenschilddrüsen wurden durch ein Zellsieb („Cell Strainer“ von Falcon, bezogen über die Firma Noras, Würzburg) mit einer Porengröße von 70 μ m gepresst und mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 402xg zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml zehnfach verdünntem Lysepuffer (Kap. 3.2) resuspendiert. Nach zwei Minuten wurden die Zellen gewaschen und in 500 μ l PBS aufgenommen. Jeweils 125 μ l dieser Zellsuspension wurden auf einen vorbereiteten Objektträger (R. Langenbrinck, Tenningen, Deutschland) bei 400xg für fünf Minuten zentrifugiert.

3.10 Fotodokumentation

Die immunhistologischen Schnitte wurden mit dem Lichtmikroskop BH2 der Fa. Olympus (Hamburg, Deutschland) ausgewertet und mit der Olympus Digitalkamera C-5050 Zoom aufgenommen. Als Software für die Steuerung der Kamera

wurde der Camera Controller der Fa. Pine Tree Computing (Olivette, USA) verwendet. Die intraoperativen Photographien erfolgten entweder durch das Operationsmikroskop oder im Makromodus der Kamera.

3.11 Auswertung

Die mittlere Funktionszeit der Transplantate in den jeweiligen Versuchen wurde in Tagen mit der zugehörigen Standardabweichung in Microsoft Excel[®] berechnet. Die Auswertung der Immunhistologie erfolgte semiquantitativ mit einem gebildeten Mittelwert aus allen zu dem jeweiligen Zeitpunkt explantierten Nebenschilddrüsen mit folgender Einteilung:

- keine positiven Zellen
- + $\leq 10\%$ positive Zellen
- ++ 10% - 50% positive Zellen
- +++ > 50% positive Zellen

4 Ergebnisse

Über die zur Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplante führenden zellulären Mechanismen ist sowohl im Menschen als auch im Nager, dem Kleintiermodell für Transplantationen, wenig bekannt. Der Großteil der hierzu publizierten Daten stammt aus der Zeit, als monoklonale Antikörper noch nicht routinemäßig für immunhistochemische Untersuchungen verfügbar waren. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die zellulären und molekularen Vorgänge nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation untersucht. Dabei wurde insbesondere die Beteiligung von T-Lymphozyten und Makrophagen an der Abstoßung untersucht.

4.1 Durchflußzytometrische und immunhistologische Untersuchung frisch explantierter Nebenschilddrüsen

Mit dem Organtransplantat werden so genannte „passenger leucocytes“ in den Empfänger übertragen (s. Einleitung). Sie beeinflussen maßgeblich die Transplantat-Immunogenität, da sie in verschiedene lymphatische Organe des Empfängers auswandern und hier als antigenpräsentierende Zellen eine gegen das Transplantat gerichtete Immunantwort induzieren.

Aus diesem Grund wurden Nebenschilddrüsen aus Wistar-Furth-Ratten -- sie waren bei diesen Untersuchungen die Organspender -- auf „passenger leucocytes“ hin untersucht. In der Durchflußzytometrie zeigte sich, dass die aus Nebenschilddrüsen isolierten Zellen im Vergleich zu iliacaalen Lymphknotenzellen größer und granulärer waren (Abb. 4.1). Insgesamt waren MHC-Klasse-I-positive Zellen (hierunter befanden sich vermutlich auch Parenchymzellen), CD45 (Ox1)-positive Zellen und MHC-Klasse-II-positive Zellen nachzuweisen. Mit 19% Ox1-positiven Leukozyten waren doch ein deutlicher Anteil der isolierten Zellen „passenger leucocytes“, auch wenn der Großteil, wie erwartet, Parenchymzellen war.

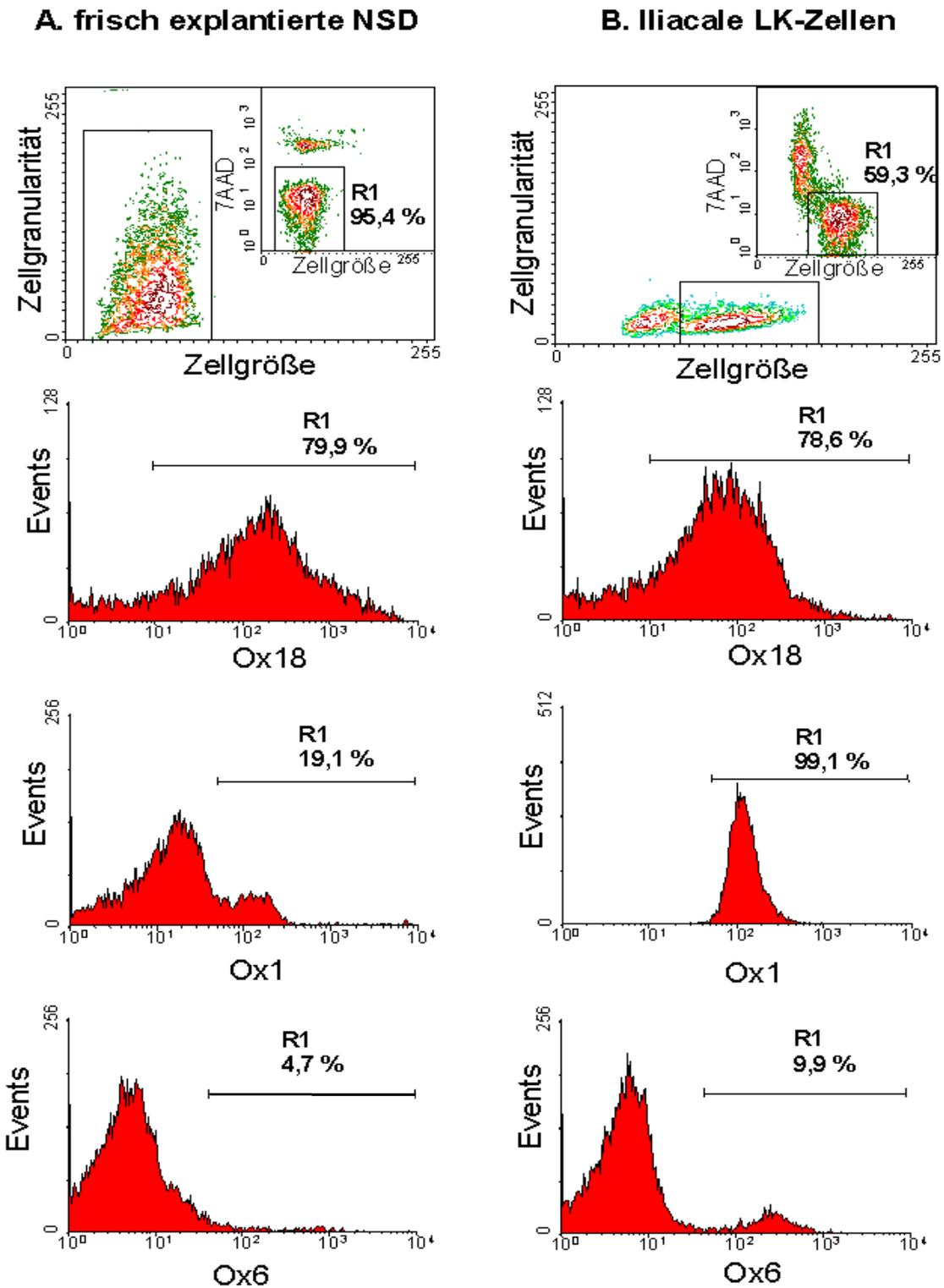


Abb. 4.1 Durchflußzytometrische Analyse frisch explantierter Nebenschilddrüsen (NSD) aus Wistar-Furth-Ratten. NSD-Zellen bestehen zum Großteil aus kleinen MHC-Klasse-I-positiven (OX18-positiven) Zellen (vermutlich granuläre Parenchymzellen) und zum geringen Anteil aus OX1-positiven Leukozyten. Zum Vergleich: iliacale Lymphozyten. Für diese Analyse wurden ausschließlich lebende (7-AAD-negative) Zellen ausgewertet (R1-Zellen im Inlet). Repräsentative Darstellung aus drei Versuchen.

Auch immunhistologisch wurden „passenger leucocytes“ in den Nebenschilddrüsen nachgewiesen. So befanden sich in den septalen Arealen MHC-Klasse-II-positive Zellen, Makrophagen (ED1⁺, ED2⁺) sowie ICAM-1-positive Zellen. Nicht nachgewiesen wurden: T-Lymphozyten, weder CD8 noch CD25 positive, sowie B Lymphozyten, NK Zellen oder Dendritische Zellen (Tabelle 4.1 u. Abb. 4.2). Sämtliche Parenchymzellen waren MHC-Klasse-I positiv (Abb. 4.1, Abb. 4.2).

Somit ist gesichert, dass frisch explantierte Nebenschilddrüsen einen messbaren Anteil an „passenger leucocytes“ enthalten. Hierbei handelt es sich in erster Linie um MHC-Klasse-II-positive Makrophagen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Semiquantitative Auswertung (Kap. 3.11) immunhistologischer Präparate frisch explantierter Nebenschilddrüsen (jeweils n=5) zum Nachweis von „passenger leucocytes“. Repräsentative Bilddokumente zu den Färbungen sind in Abb. 4.2 zusammengefasst. In Klammern ist die Bezeichnung des jeweiligen Antikörpers angegeben (Tabelle 3.4).

Untersuchte Zellen	Anzahl positiver Zellen
MHC-Klasse-I-positive Zellen (Ox18)	+++
MHC-Klasse-II-positive Zellen (Ox6)	+
Makrophagen (ED1,ED2)	+
Adhäsionsmolekül CD54 oder ICAM-1 (1A29)	+
Dendritische Zellen (Ox62)	-
T-Lymphozyten (R73)	-
CD-8 T-Lymphozyten (341)	-
aktivierte IL-2R-positiv T-Lymphozyten (Ox39)	-
NK-Zellen (10/78)	-
B-Lymphozyten (Ox33)	-

Zeichenerklärung: - keine positiven Zellen + ≤ 10% positive Zellen
 ++ 10% - 50% positive Zellen +++ > 50% positive Zellen

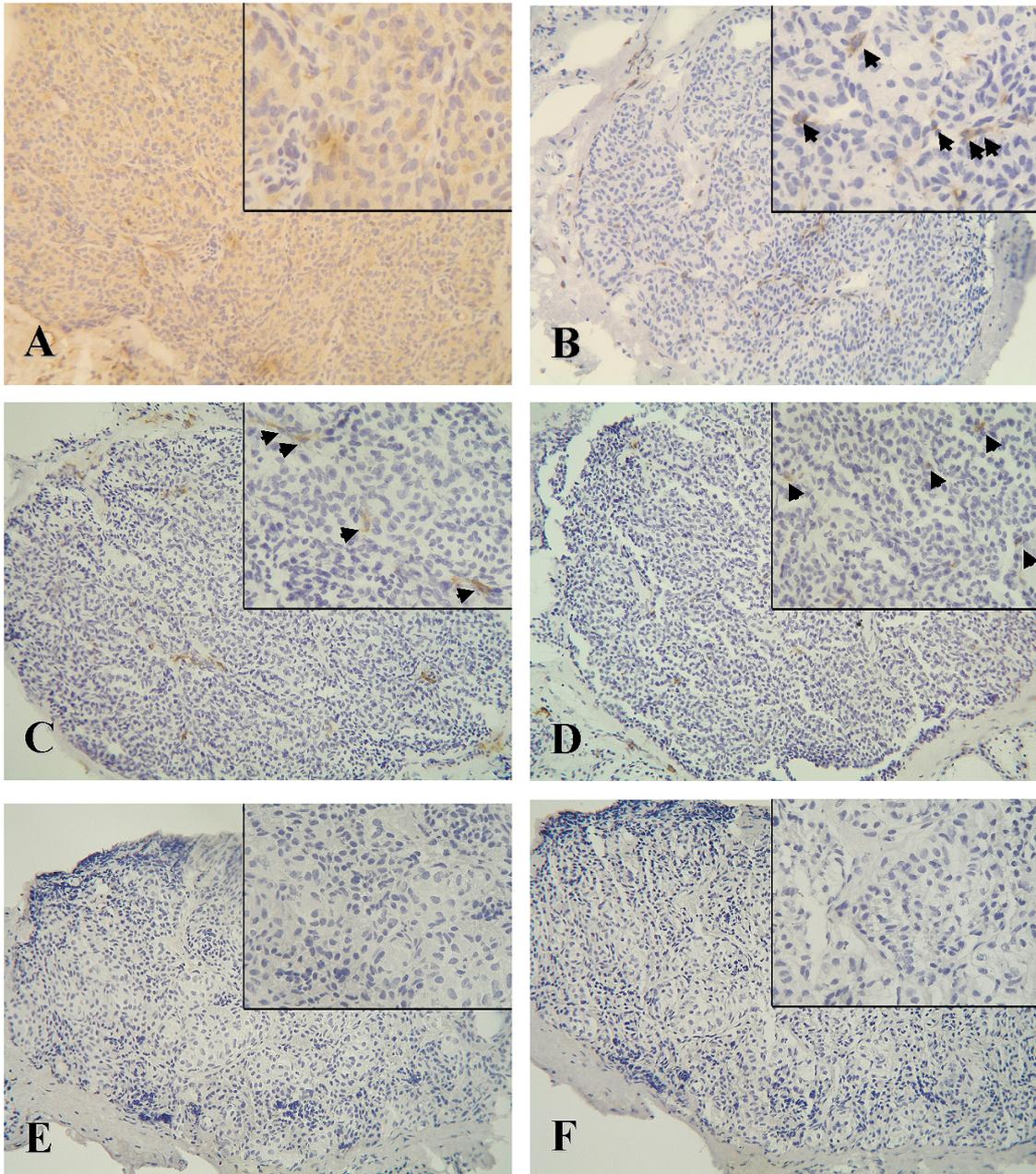


Abb. 4.2: Immunhistologische Untersuchungen frisch explantierter Nebenschilddrüsen. Sowohl MHC-Klasse-I-exprimierende Parenchymzellen (A) als auch MHC-Klasse-II-positive Leukozyten (B) sind eindeutig nachweisbar. Makrophagen (C,D) sind mit einem Anteil von maximal 10% (Tabelle 4.1) vorhanden, während T-Lymphozyten (E,F) nicht zu finden sind (n=5). Färbung mit Ox18(A), Ox6(B), ED2(C), ED1(D), R73(E) und Ox39(F); Vergrößerung x200 u. x400 (Insets).

4.2 Auswirkung von Parathyreoidektomie und Nebenschilddrüsentransplantation auf die Kalziumhomöostase

Nach Explantation der Nebenschilddrüsen fiel der Serumkalziumspiegel innerhalb weniger Tage aus dem physiologischen (2,0-2,7 mmol/l) in den hypokalzämischen (<1,9 mmol/l) Bereich. Von den 66 für diese Arbeit parathyreoidektomierten LEW-Tieren wurden 15 (ca. 23%) nicht hypokalzämisch. Bei der Mehrzahl der parathyreoidektomierten Tiere lag der Kalziumwert sieben Tage nach Explantation bei $1,6 \pm 0,2$ mmol/l (n=51). Die Folge einer erfolgreichen Parathyreoidektomie war eine dauerhafte Hypokalzämie (Abb. 4.3).

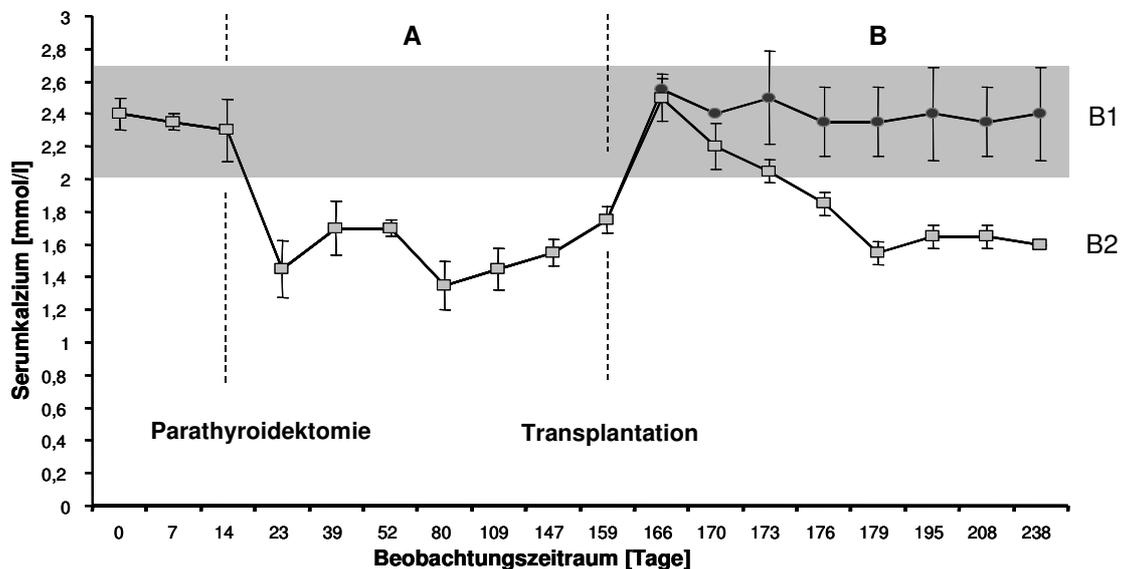


Abb. 4.3: Serumkalzium-Verlauf nach Parathyreoidektomie (A) und Transplantation (B). Der physiologische Serumkalziumspiegel der LEW-Ratte liegt zwischen 2,0 und 2,7 mmol/l (grau unterlegter Bereich). Nach Parathyreoidektomie blieb der Kalziumspiegel über 100 Tage stabil im hypokalzämischen Bereich (A, n=4). Erst nach Transplantation von Nebenschilddrüsen stieg der Kalziumspiegel wieder an. Bei syngen transplantierten Tieren (B1, n=2) blieb er dauerhaft im physiologischen Bereich. Nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation (B2, n=2) hingegen sank der Kalziumspiegel zwei Wochen nach Transplantation erneut ab. Dies war der Zeitpunkt der Abstoßung (Tabelle 4.2).

Erst durch die heterotope Transplantation von Nebenschilddrüsen stieg der Kalziumwert wieder in den physiologischen Bereich. Bei 4% (n=2) der transplantierten LEW-Tiere blieb diese Therapie erfolglos. Nach syngener Transplantation blieb das Serumkalzium über den gesamten Untersuchungszeitraum von 100 Tagen im physiologischen Bereich. Dies unterstreicht, dass das von Ne-

benschilddrüsentransplantaten produzierte Parathormon den Kalziumspiegel reguliert. Auch nach allogener Transplantation kam es zu einem Anstieg des Serumkalziumspiegels, der jedoch zwei Wochen nach Transplantation als Zeichen der Abstoßung wieder in den hypokalzämischen Bereich abfiel.

4.3 Untersuchungen zur Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate in nicht-sensibilisierten Tieren

4.3.1 Bestimmung von Transplantatfunktionszeiten

Hypokalzämische Tiere wurden zwei bis drei Wochen nach der Parathyreoidektomie transplantiert (Abb. 3.2). Der Kalziumspiegel wurde regelmäßig überprüft, um den Zeitpunkt der Abstoßung möglichst genau zu erfassen. Die Abstoßung von Nebenschilddrüsentransplantaten ist charakterisiert durch den erneuten Abfall des Kalziumspiegels unter 2,0 mmol/l. Mit diesem Vorgehen wurde der Abstoßungszeitpunkt auf $15,8 \pm 1,8$ Tage (Tabelle 4.2) bestimmt.

Zusätzlich wurden die Transplantate auf die Präsenz von Parathormon (PTH) mit der RT-PCR Methode überprüft. Sowohl bei nicht-transplantierten als auch bei syngen transplantierten Nebenschilddrüsen war PTH mRNA zum Zeitpunkt der Organentnahme nachweisbar. Hingegen waren allogene Nebenschilddrüsentransplantate ausschließlich bis zum Zeitpunkt der Abstoßung positiv für PTH mRNA (Abb. 4.4). Die histologische Analyse zu diesem Zeitpunkt zeigte vollständig zerstörte Nebenschilddrüsen, so dass – wie erwartet – der abermalige Abfall des Kalziumspiegels und der fehlende Nachweis von PTH mRNA auf die Zerstörung der PTH-produzierenden Zellen während der Abstoßung zurückzuführen sind (Abb. 4.3 u. 4.5).

Tabelle 4.2: Funktionszeiten allogener Nebenschilddrüsentransplantate. Die Funktionszeit wurde durch Messung des Serumkalziums zu unterschiedlichen postoperativen Zeitpunkten bestimmt. Die Kalziumwerte der fünf Versuchstiere (V1-1-1 bis V1-1-5) sind in mmol/l angegeben. Der Abstoßungszeitpunkt ist der Tag, an dem das Serumkalzium wieder unter 2,0 fällt. (-): keine Messung durchgeführt.

Tier	Tage postoperativ								Abstoßungszeitpunkt [Tag]
	0	7	10	11	13	14	15	17	
V1-1-1	1,5	-	2,3	-	1,8	-	-	1,8	13
V1-1-2	1,7	2,6	-	2,1	-	2,1	-	1,9	17
V1-1-3	1,7	2,1	-	-	2,1	-	2,0	1,8	17
V1-1-4	1,7	2,1	-	2,1	-	-	2,0	1,7	17
V1-1-5	1,8	2,5	-	2,3	-	2,1	1,9	-	15
Mittelwert:									15,8
Standardabweichung:									1,8

Wie erwartet, scheint ein direkter Zusammenhang zwischen dem Abfall des Kalziumspiegels, dem fehlenden Nachweis von PTH mRNA und der Zerstörung der Transplantate zu bestehen. Damit stellt der Kalziumwert einen sehr einfach zu bestimmenden Parameter zur Funktionsüberwachung transplantierte Nebenschilddrüsen dar.

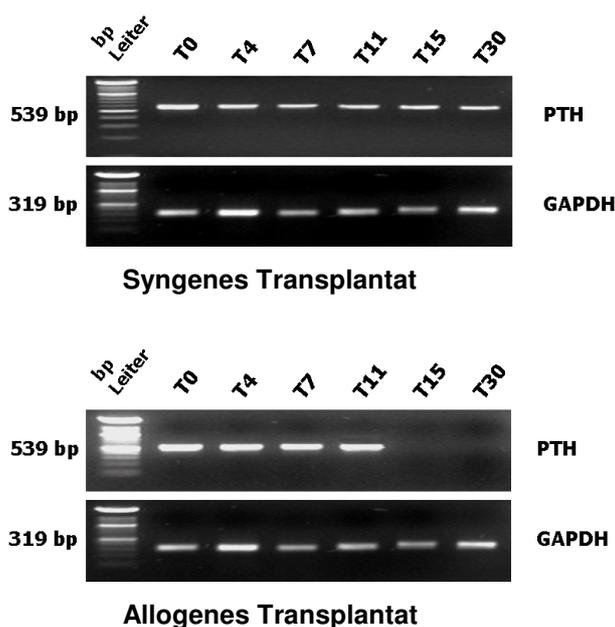


Abb. 4.4: Qualitativer Nachweis von PTH Transkripten in syngenem und allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten als Zeichen ihrer Funktion. In syngenem Transplantat ist PTH Transkript über den gesamten Beobachtungszeitraum von 30 Tagen nachzuweisen (oberes Bild). Nach Transplantation allogener Nebenschilddrüsen ist PTH mRNA nur bis Tag 11 nachweisbar. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass allogene Transplantate in aller Regel zwischen Tag 11 und Tag 17 ihre Funktion verlieren (Tabelle 4.2). Repräsentative Darstellung aus 2 untersuchten Tieren zu jedem Zeitpunkt (Tabelle A.1).

4.3.2 Dynamik der zellulären Transplantatinfiltration

Innerhalb von etwas mehr als zwei Wochen waren allogene Nebenschilddrüsen vollständig vom Immunsystem zerstört (Abb. 4.5). Hierzu wurde die Dynamik der zellulären Infiltration im Detail analysiert.

Allogen und syngen transplantierte Nebenschilddrüsen wurden zu festgelegten Zeitpunkten explantiert und analysiert. Die gefärbten Schnitte wurden semi-quantitativ bewertet (Kap. 3.11). Die den folgenden Diagrammen zugrunde liegenden Tabellen sind im Anhang aufgeführt (Tabelle A.2 – A.4).

Es wurden Zellen der unspezifischen Immunität (Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Dendritische Zellen) und der spezifischen Immunität (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten) untersucht. Mit der syngen Kontrolle wurden operationsbedingte und damit Antigen-unabhängige zelluläre Veränderungen im und um das Transplantat identifiziert.

Nachweis MHC-Klasse-II-positiver und ICAM-1-positiver Zellen

MHC-Klasse-II-positive Zellen wurden mit dem Antikörper Ox6 und ICAM-1-positive Zellen mit dem Antikörper 1A29 nachgewiesen. Beide Oberflächenmoleküle werden von Zellen des Immunsystems exprimiert. So ist ICAM-1 ein wichtiges Adhäsionsmolekül für Leukozyten, das die Durchwanderung des Endothels steuert. MHC-Klasse-II-Moleküle sind auf Dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen zu finden. Die in Abb. 4.5 gezeigte Zunahme des Zellinfiltrates spiegelt sich ebenfalls in der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Analysen wider: Zwischen Tag 4 und Tag 11 war ein deutlicher Anstieg MHC-Klasse-II-positiver- und ICAM-1-positiver Zellen nachweisbar (Abb. 4.6).

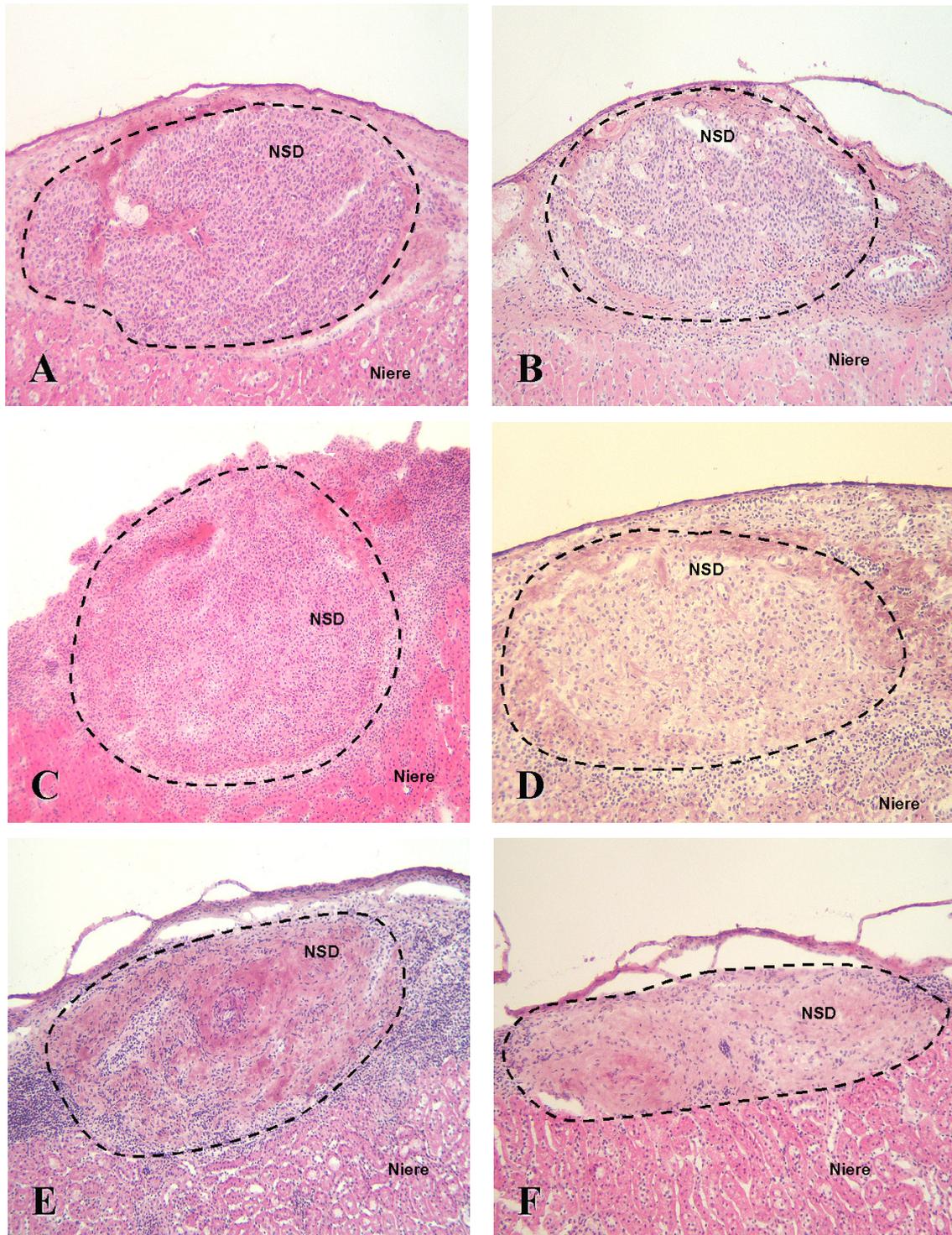


Abb. 4.5: Histologie allogener Nebenschilddrüsentransplantate (NSD). Die Transplantate sind am Tag 0 (A) und Tag 3 (B) noch gut vom umgebenden Nierenparenchym abzugrenzen, während sich am Tag 7 (C) eine ödematöse Schwellung mit einem massiven Infiltrat zeigt. Über Tag 11 (D) und 13 (E) kommt es zu einem zunehmenden fibrotischen Umbau der Transplantate. Am Tag 30 (F) ist die Nebenschilddrüse vollständig fibrosiert. Das Transplantat ist jeweils mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet, Vergrößerung x100.

Auch in syngenem Nebenschilddrüsen-Transplantat stieg der Anteil MHC-Klasse-II-positiver- und ICAM-1-positiver Zellen an. Dies zeigt, wie stark der operative Eingriff die Zellen des Immunsystems beeinflusst. Die allogene Situation verstärkte die Infiltration der Nebenschilddrüsen mit Zellen des Empfängerimmunsystems (Abb. 4.7). MHC-Klasse-II-positive Zellen waren auch noch am Tag 30, wenn das Transplantat vollkommen zerstört war (Abb. 4.5), im Restfiltrat nachzuweisen.

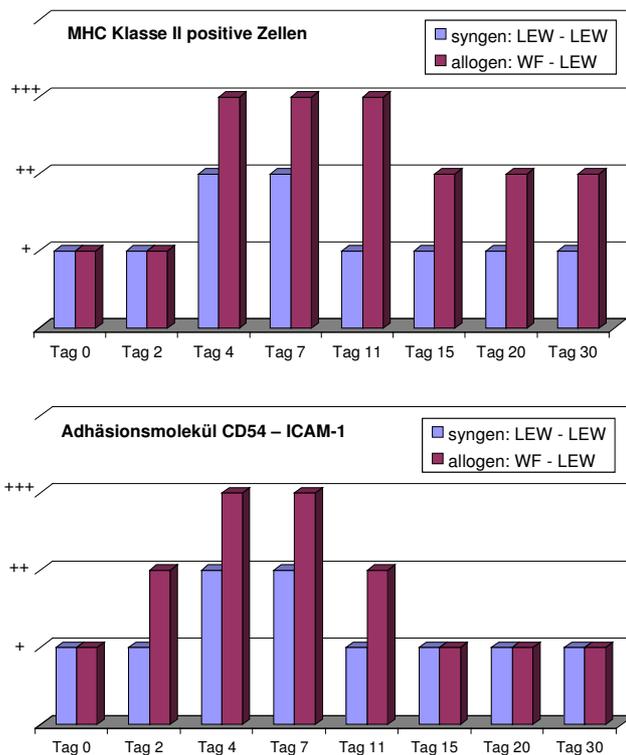


Abb. 4.6: Semiquantitative Auswertung von MHC-Klasse-II- und ICAM-1-positiven Zellen in syngenem und allogenen Nebenschilddrüsen-Transplantaten. Sowohl in syngenem als auch allogenen Transplantaten ist eine deutliche Infiltration mit MHC-Klasse-II-positiven bzw. ICAM-1-positiven Immunzellen zwischen Tag 4 und Tag 11 zu beobachten. Die allogene Situation verstärkt die Infiltration der Nebenschilddrüsen mit Immunzellen des Empfängers. Siehe hierzu auch Abb. 4.7.

Zeichenerklärung:

- +++ >50% positive Zellen
- ++ 10%-50% positive Zellen
- + ≤ 10% positive Zellen

Nachweis von B-Lymphozyten, NK-Zellen und Dendritischen Zellen

B-Lymphozyten wurden mit dem Antikörper Ox33, NK-Zellen mit dem Antikörper 10/78 und Dendritische Zellen mit dem Antikörper Ox62 nachgewiesen. B-Lymphozyten traten nur am Rand allogener Nebenschilddrüsen zwischen Tag 7 und 30 auf (Abb. 4.8). In syngenem Nebenschilddrüsen-Transplantat waren keine B-Lymphozyten nachzuweisen (Abb. 4.9).

NK-Zellen wurden nur zu einem geringen Anteil in syngenem Transplantat nachgewiesen. In allogenen transplantierten Epithelkörperchen infiltrierten NK-Zellen ab Tag 3 das Transplantat und erreichten am Tag 7 ihr Maximum (Abb. 4.8 u. 4.9). Ab Tag 30 waren nur noch wenige NK-Zellen im Transplantat nachweisbar (vgl. Abb. 4.8).

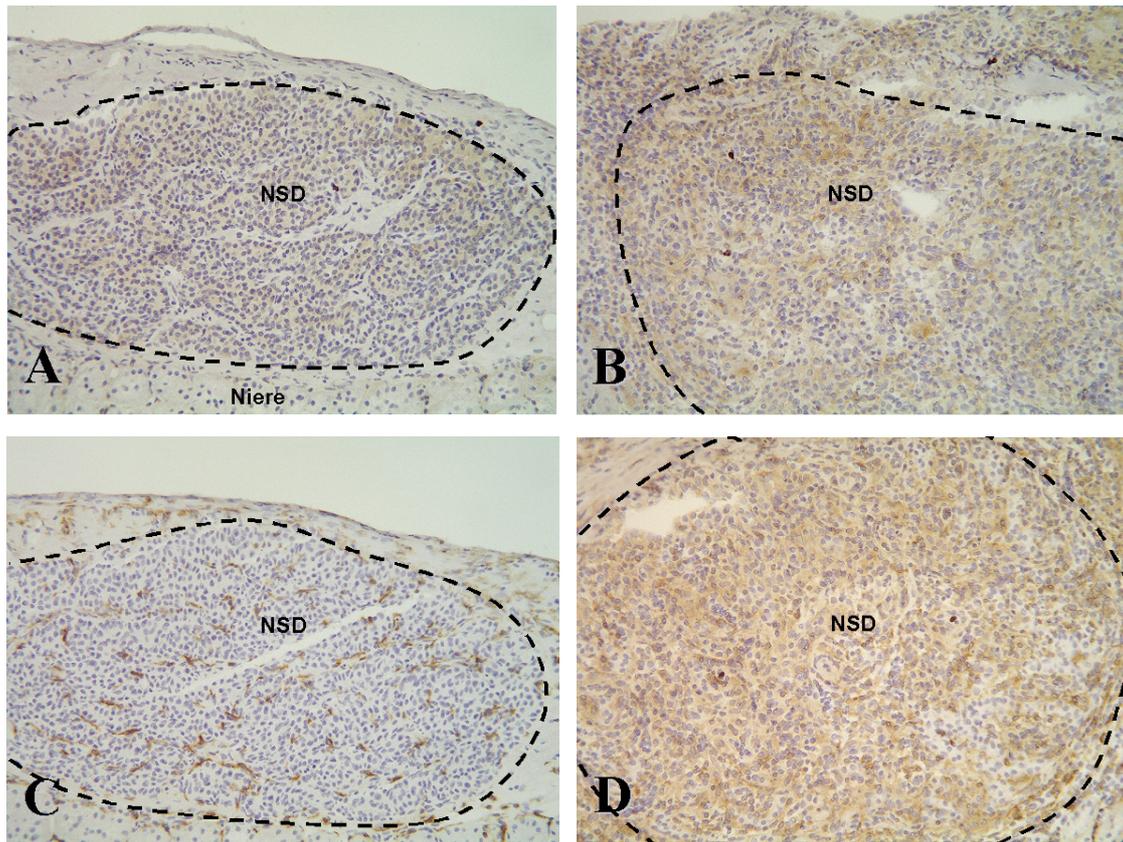


Abb. 4.7: Immunhistologischer Nachweis ICAM-1-positiver und MHC-Klasse-II-positiver Zellen in syngenem und allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten. Sowohl in den syngenem (A,C) als auch in den allogenen (B,D) Transplantaten findet eine starke Infiltration durch ICAM-1-positiv (A,B) und MHC-II-positiv (C,D) Immunzellen statt. Diese Infiltration ist nach allogener Transplantation deutlich stärker als in den syngenem Transplantaten (Abb. 4.6). Darstellung repräsentativer Färbungen vom Tag 7 nach Transplantation; Vergrößerung x200.

Dendritische Zellen machten nur einen geringen Anteil am Infiltrat syngener Transplantate aus. Sie befanden sich vor allem im Randgebiet des Organs (Abb. 4.9). Auch nach allogener Transplantation waren Dendritische Zellen mit

4 ERGEBNISSE

ca. 20% Bestandteil des Infiltrats. Obgleich ihr Anteil abnahm, waren sie doch über den gesamten Beobachtungszeitraum nachweisbar (Abb. 4.8).

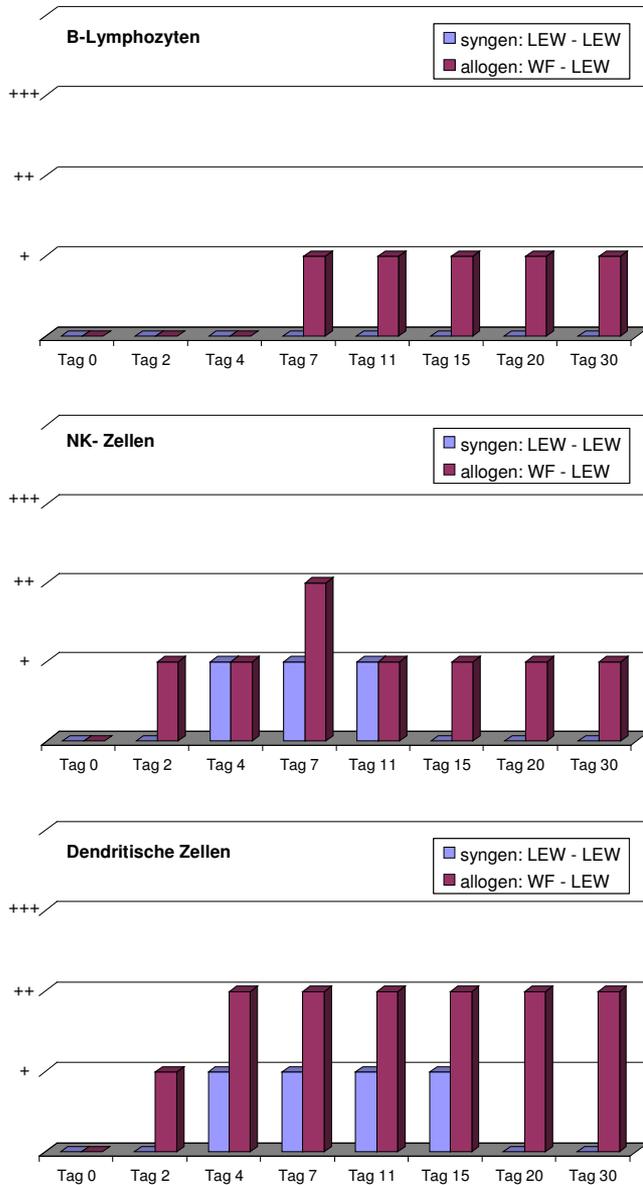


Abb. 4.8: Semiquantitative Auswertung der Infiltration von Nebenschilddrüsentransplantaten mit B-Lymphozyten, NK-Zellen und Dendritischen Zellen. Die Anzahl von B-Lymphozyten und NK-Zellen ist in allogenen transplantierten Nebenschilddrüsen eher gering, während Dendritische Zellen ein mittelstarkes Infiltrat bilden (Abb. 4.9). Obwohl dieses mittelstarke Infiltrat semiquantitativ mit ++ bewertet ist, was 10-50% an positiven Zellen entspricht, liegt die Anzahl der Dendritischen Zellen bei ca. 20% während der akuten Abstoßung. So ist ihre Anzahl, verglichen mit anderen Zellen, wie beispielsweise Makrophagen (siehe Abb. 4.13), eher gering.

Zeichenerklärung:

- +++ >50% positive Zellen
- ++ 10%-50% positive Zellen
- + ≤ 10% positive Zellen

B-Lymphozyten, NK-Zellen und Dendritische Zellen sind normalerweise nicht in Epithelkörperchen zu finden (Tabelle 4.1). Diese Daten belegen, dass sich die Abstoßung ab einem gewissen Zeitpunkt nach Transplantation zu einem multi-zellulären Ereignis entwickelt, an dem nahezu alle Zellen des Immunsystems beteiligt sind.

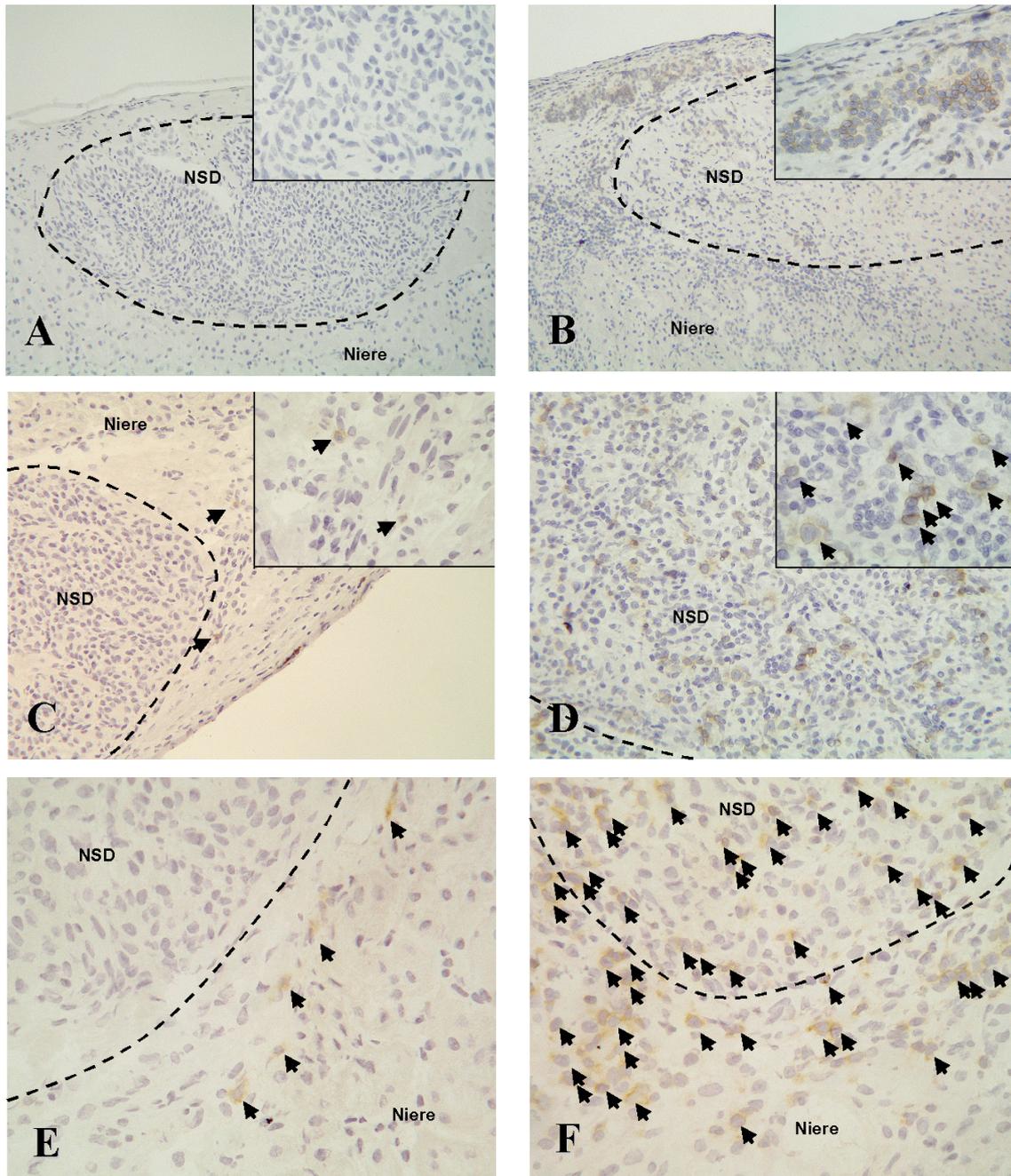


Abb. 4.9: Immunhistologischer Nachweis von B-Lymphozyten, NK-Zellen und Dendritischen Zellen in syngenem und allogenen Nebenschilddrüsen-Transplantaten. B-Lymphozyten (A,B) sind in syngenem Transplantat (A) nicht nachweisbar. Auch in allogenen Transplantat (B) ist ihre Anzahl eher gering. NK-Zellen (C,D) und Dendritische Zellen (E,F) lassen sich sowohl in syngenem (C,E) als auch in allogenen (D,F) Transplantat nachweisen. Die Anzahl Dendritischer Zellen bewegt sich in der semiquantitativen Bewertungsskala zwar zwischen 10-50% (entspricht ++), doch liegt ihr wahrer Anteil eher im Bereich um die 20% (Abb. 4.8). Im Gegensatz zu anderen Zellen wie Makrophagen (Abb. 4.13) ist ihre Anzahl sehr gering. Darstellung repräsentativer Färbungen von Tag 7, Vergrößerung x100 (A,B), x200 (C,D) x400 (E,F, Insets).

Nachweis von T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind normalerweise in Epithelkörperchen nicht zu finden (Tabelle 4.1). In syngen Nebenschilddrüsentransplantaten erschienen sie erst ab Tag 11 in geringer Zellzahl (Abb. 4.10). Am Tag 30 waren keine T-Lymphozyten mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigten sich T-Lymphozyten in allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten sowohl im umgebenden Infiltrat als auch im Transplantat. Hier waren sie bereits am Tag 2 vorzufinden, wobei sich ein Großteil der T-Lymphozyten sich im Randgebiet befand (Abb. 4.11).

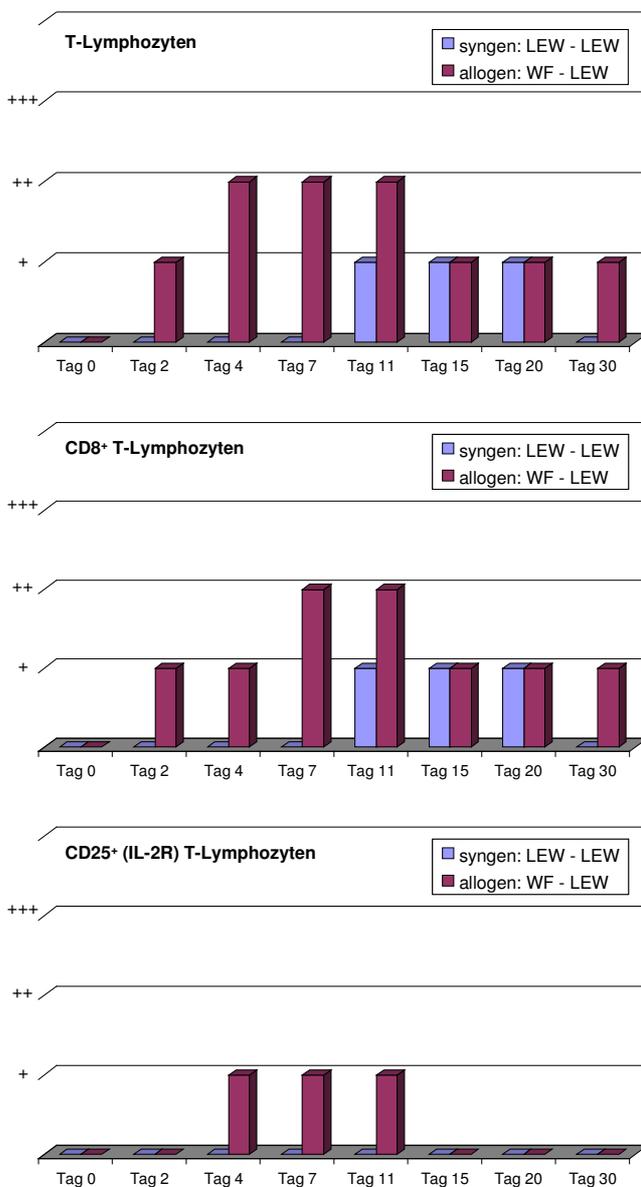


Abb. 4.10: Semiquantitative Auswertung der Infiltration von Nebenschilddrüsentransplantaten mit T-Lymphozyten. Die Gesamtzahl der T-Lymphozyten wurde mit dem anti-T-Zellrezeptor Antikörper R73 ermittelt (oben). Diese Analysen wurden mit weiteren Antikörpern ergänzt: 341 (CD8+ T-Lymphozyten) und OX39 (CD25+ T-Lymphozyten). Hierbei zeigte sich, dass aktivierte T-Lymphozyten, die für die Abstoßung allogener Organe eine wichtige Rolle spielen, nur in allogenen Transplantaten nachweisbar waren (Abb. 4.11).

Zeichenerklärung:

- +++ >50% positive Zellen
- ++ 10%-50% positive Zellen
- + ≤ 10% positive Zellen

Die infiltrierenden T-Lymphozyten wurden mit den Antikörpern 341 (CD8-positive T-Lymphozyten) und Ox39 (CD25 oder α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors) weiter differenziert. Der CD4-Antikörper (W3/25) wurde auf Grund seiner Kreuzreaktivität mit Makrophagen nicht verwendet.

In syngenem Nebenschilddrüsen-Transplantaten befanden sich wenige CD8-positive T-Lymphozyten zwischen Tag 11 und Tag 20. Allerdings waren hier keine aktivierten (IL-2-Rezeptor-positiven) T-Lymphozyten in den syngenem Transplantaten nachweisbar. In allogenen Nebenschilddrüsen-Transplantaten waren bereits am Tag 3 CD8-positive sowie CD25-positive T-Lymphozyten zu beobachten. Sie hatten ihren größten Anteil am Infiltrat am Tag 7 (Abb. 4.10 u. 4.11). Die CD25-positiven T-Lymphozyten waren bis auf wenige Ausnahmen ausschließlich im Transplantat und kaum im Randgebiet zu finden (Abb. 4.11). Am Tag 11 waren nur noch sehr wenige CD25-positive T-Lymphozyten vorhanden, und am Tag 15, dem Zeitpunkt der völligen Zerstörung, (Abb. 4.5) waren sie vollständig verschwunden.

Nachweis von Makrophagen

Makrophagen wurden mit dem Antikörper ED1 nachgewiesen, der alle Subtypen von Makrophagen erfasst. Zusätzlich wurde der Antikörper ED2 eingesetzt, der nur bestimmte Subtypen von Makrophagen anfärbt, vor allem Gewebemakrophagen (Angaben laut Serotec Ltd, Oxford, England; www.serotec.com). Bereits am Tag 2 waren infiltrierende Makrophagen in syngenem und allogenen Transplantaten nachweisbar, wobei das Infiltrat in den allogenen transplantierten Nebenschilddrüsen deutlich stärker war. Nach dem Maximum am Tag 7 (Abb. 4.12), nahm ihre Anzahl langsam ab, obgleich sie zu jedem Beobachtungszeitpunkt den größten Anteil am Infiltrat ausmachten (Abb. 4.13). Dabei wird die massive Präsenz der Makrophagen durch die semiquantitative Bewertung nicht vollständig abgebildet. Dies liegt an der Größe des Intervalls, das einen Anteil von 10 bis 50% umfasst. Um die Semiquantifizierung aber übersichtlich zu halten, wurden keine weiteren Subintervalle eingeführt.

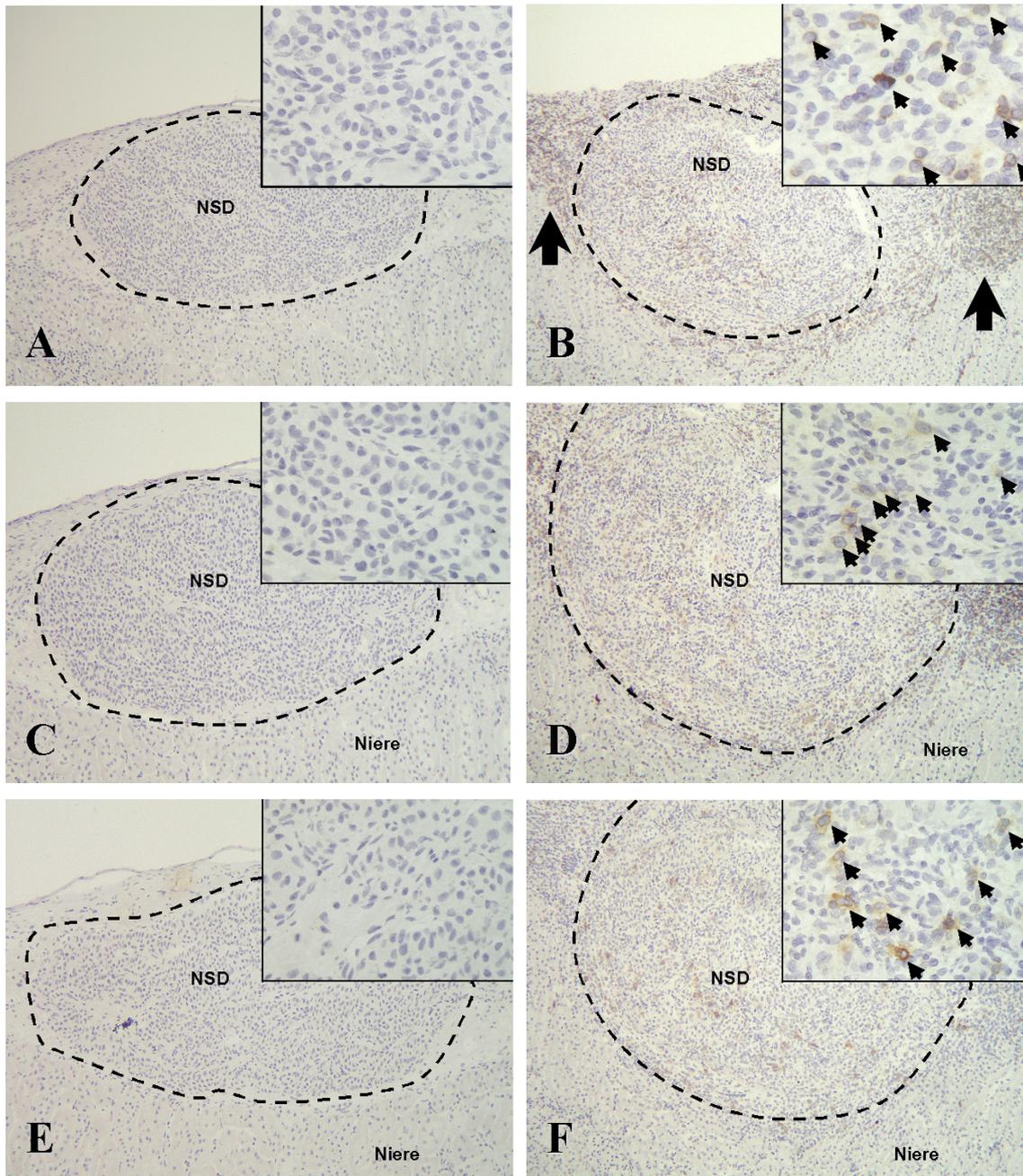


Abb. 4.11: Immunhistologischer Nachweis von T-Lymphozyten in syngenem und allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten (NSD). Syngene Transplantate sind auf der linken Seite dargestellt (A,C,E), allogene auf der rechten Seite (B,D,F). Die Gesamtzahl der T-Lymphozyten (A,B), identifiziert durch den T-Zellrezeptor (R73), beinhaltet neben CD8-positiven T-Lymphozyten (C,D) auch CD25-positiven T-Lymphozyten (E,F). Es befinden sich, verglichen mit den Makrophagen (Abb. 4.13), eher wenige T-Lymphozyten innerhalb der transplantierten Nebenschilddrüse. Ein Großteil der T-Lymphozyten befindet sich im Randinfiltrat (große Pfeile, B). Weiterhin sind die für die Abstoßung allogener Organe wichtigen aktivierten CD25-positiven T-Lymphozyten nur in allogenen Transplantaten nachweisbar, nicht in der syngenem Kontrolle. Darstellung repräsentativer Färbungen vom Tag 7, Vergrößerung x100, x400 (Inset).

4 ERGEBNISSE

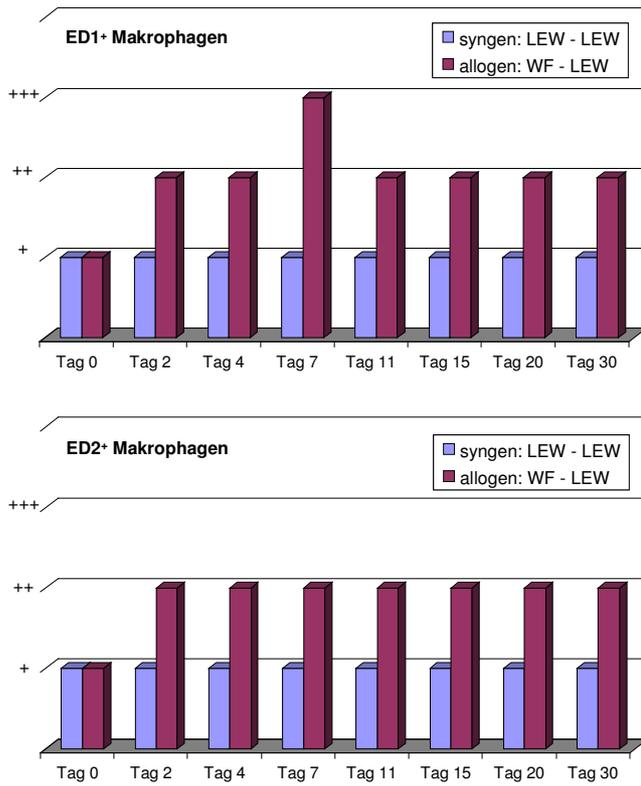


Abb. 4.12: Semiquantitative Auswertung der Infiltration von Nebenschilddrüsentransplantaten mit Makrophagen. Makrophagen sind während der gesamten Abstoßung bis Tag 15 (Tab. 44.2) und auch danach in allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten präsent. Nach syngener Transplantation zeigt sich nur ein geringes Infiltrat aus Makrophagen. Aufgrund der semiquantitativen Bewertungsskala sind nur scheinbar keine Änderungen in der Anzahl der Makrophagen festzustellen.

Zeichenerklärung:

- +++ >50% positive Zellen
- ++ 10%-50% positive Zellen
- + ≤ 10% positive Zellen

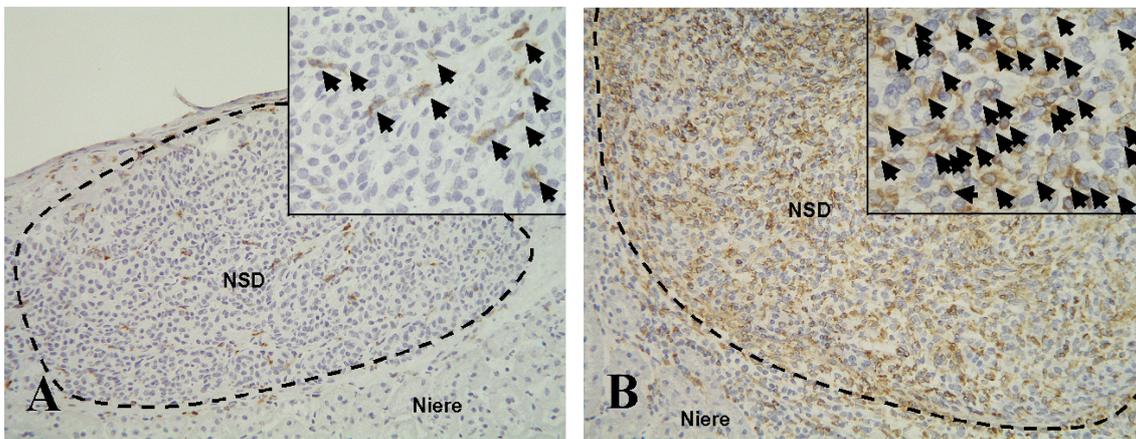


Abb. 4.13: Immunhistologischer Nachweis von Makrophagen in syngenen (A) und allogenen (B) Nebenschilddrüsentransplantaten (NSD). Hierbei zeigt sich eine massive Präsenz von Makrophagen im allogenen Transplantat im Gegensatz zum syngenen Transplantat (Abb. 4.12). Darstellung repräsentativer Färbungen vom Tag 7, Vergrößerung x200, x400 (Inset).

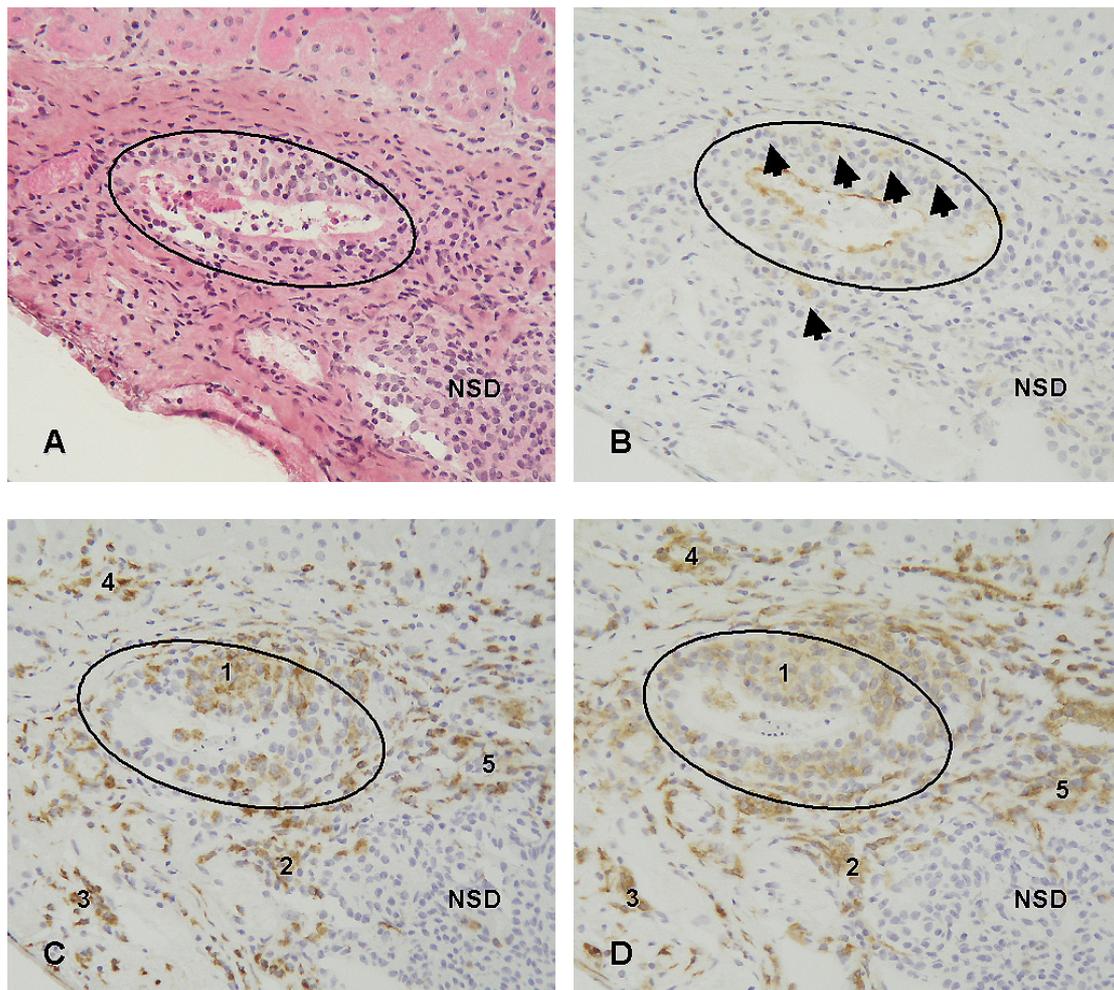


Abb. 4.14: Sequentielle immunhistologische Färbungen allogener Nebenschilddrüsen-transplantaten (NSD) am Tag 4. In sämtlichen Arealen, bezeichnet mit 1 bis 5 (C, D), in denen sich Makrophagen (C) aufhalten, sind auch MHC-Klasse-II-positive Zellen nachzuweisen (D). Somit scheint es sich bei den MHC-Klasse-II-positiven Zellen um aktivierte Makrophagen zu handeln. Weiterhin sind diese Zellen auch positiv für ICAM-1 (B, Pfeile). HE-Färbung (A), 1A29 (B), ED1 (C), Ox6 (D), Vergrößerung x200. Darstellung repräsentativer Färbungen.

Obwohl keine Doppelfärbungen durchgeführt wurden, schien doch der Großteil der ED1-positiven Zellen auch MHC-Klasse-II-positiv zu sein (Abb. 4.14). Färbungen von Zytospins allogener Nebenschilddrüsentransplantate zeigten, dass es sich bei den ED1-positiven Zellen um relativ große Zellen handelte. Ebenfalls groß waren die MHC-Klasse-II-positiven Zellen. Die R73 positiven T-Lymphozyten wiesen hingegen eher ein kleines Zellvolumen auf (Abb. 4.15). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei den im Transplantat nachgewiesenen MHC-Klasse-II-positiven Zellen um Makrophagen handelte.

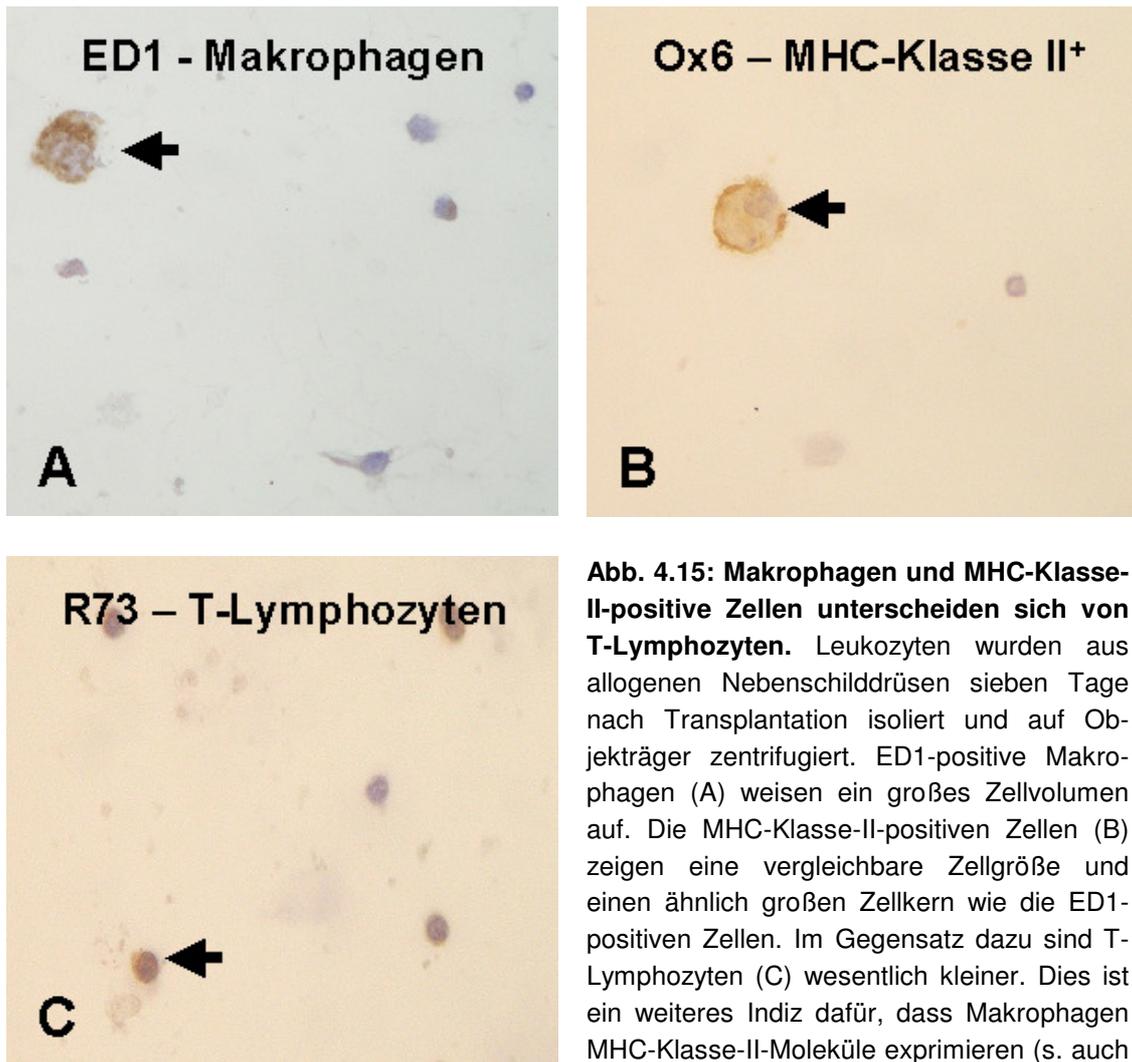


Abb. 4.15: Makrophagen und MHC-Klasse-II-positive Zellen unterscheiden sich von T-Lymphozyten. Leukozyten wurden aus allogenen Nebenschilddrüsen sieben Tage nach Transplantation isoliert und auf Objektträger zentrifugiert. ED1-positive Makrophagen (A) weisen ein großes Zellvolumen auf. Die MHC-Klasse-II-positiven Zellen (B) zeigen eine vergleichbare Zellgröße und einen ähnlich großen Zellkern wie die ED1-positiven Zellen. Im Gegensatz dazu sind T-Lymphozyten (C) wesentlich kleiner. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass Makrophagen MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren (s. auch Abb. 4.14). Vergrößerung x400.

4.3.3 Molekularbiologische Analysen Transplantat-infiltrierender Makrophagen

Die massive Präsenz von Makrophagen in allogenen Transplantaten lässt vermuten, dass sie als antigenpräsentierende Zellen und/oder Effektorzellen an der Abstoßung beteiligt sind. Als antigenpräsentierende Zellen aktivieren Makrophagen T-Lymphozyten und als Effektorzellen produzieren sie zytotoxische Moleküle wie Stickstoffmonoxid oder NO. Um abzuschätzen, welche Funktion Makrophagen im Infiltrat übernehmen, wurden explantierte Nebenschilddrüsen

drüsen auf kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 sowie iNOS („induzierbare NO-Synthase“) in der RT-PCR hin untersucht.

Expression kostimulatorischer Moleküle

Syngene und allogene Nebenschilddrüsentransplantate wurden auf mRNA für CD40, CD80 und CD86 untersucht. Nicht-transplantierte Nebenschilddrüsen und aktivierte Peritonealmakrophagen wurden als Kontrollen eingesetzt. Syngene als auch allogene Nebenschilddrüsentransplantate waren zu unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten positiv für CD40 und CD86 mRNA (Tabelle 4.3). CD80 mRNA ließ sich in allogenen Transplantaten ausschließlich während der Abstoßung nachweisen. Auch aktivierte Peritonealmakrophagen, die *in vitro* mit 10 pg/μl IFN-γ für zwei Stunden stimuliert wurden, waren positiv für CD40 und CD86 (Abb. 4.16). Somit werden Makrophagen vermutlich aufgrund des chirurgischen Eingriffs Antigen-unabhängig aktiviert, (Abb. 6.3). Dies würde erklären, warum auch syngene Transplantate ein Makrophageninfiltrat aufweisen.

Tabelle 4.3: Nachweis von CD40, CD80, CD86 mRNA (Transkripte aus der RT-PCR) während der Abstoßung syngener und allogener Nebenschilddrüsentransplantate. CD40 und CD86 mRNA ist sowohl in syngenen als auch allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten über den gesamten Beobachtungszeitraum nachzuweisen, während CD80 mRNA nur während der akuten Abstoßung vorhanden ist. Repräsentative RT-PCR-Ergebnisse sind in Abb. 4.16 dargestellt. Zu jedem Beobachtungszeitpunkt wurde das Transplantat von jeweils drei Tieren analysiert. Zur Ergebnisauswertung: Die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen im Agarosegel wurden wie folgt bewertet: 3 von 3 bzw. 2 von 3 positiv wurden mit (+) bewertet; 1 von 3 bzw. 0 von 3 positiv wurden mit (-) bewertet.

Untersuchungs- zeitpunkt [Tage]	syngene Transplantate						allogene Transplantate								
	0	2	4	7	11	20	0	2	4	7	11	13	15	20	30
GAPDH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD40	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD86	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD80	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-

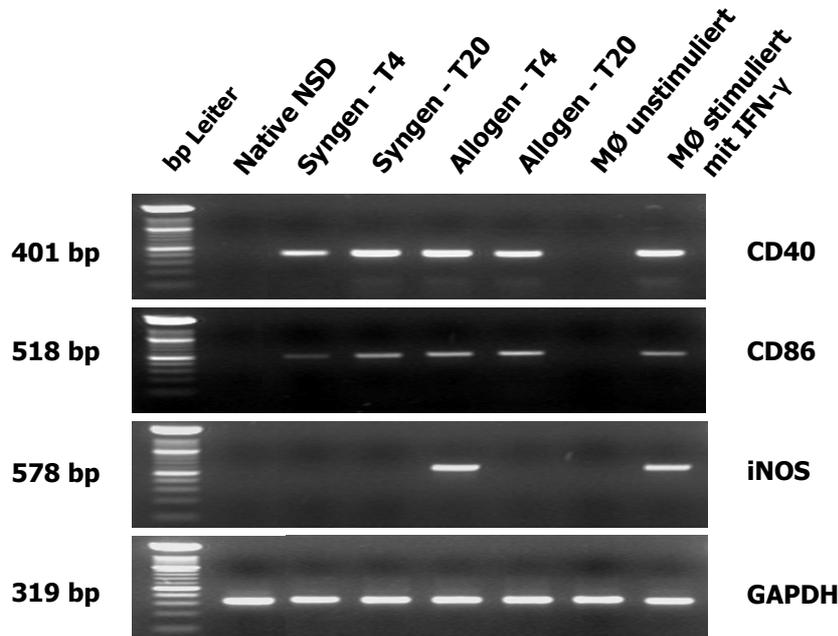


Abb. 4.16: Nachweis von CD40, CD86 und iNOS Transkripten (RT-PCR) im Agarosegel. Aktivierte Makrophagen exprimieren kostimulatorische Moleküle und iNOS (siehe auch Abb. 4.17). Infiltratzellen sowohl syngener als auch allogener Transplantate sind zu allen Beobachtungszeitpunkten positiv für CD40 und CD86. Demgegenüber sind in unstimulierten Makrophagen CD40, CD86 oder iNOS nicht nachzuweisen. Werden Makrophagen mit IFN- γ stimuliert, so exprimieren sie diese Moleküle. Repräsentative Darstellung. Der Stimulationsansatz wurde an 3 unterschiedlichen Makrophagenpräparationen durchgeführt. Zu den syngenen und allogenen Transplantaten siehe Abb. 4.17.

Expression von iNOS

Aktivierte Makrophagen exprimieren neben den Oberflächenmolekülen MHC-Klasse-II, CD40, CD80 und CD86 auch das intrazelluläre Enzym iNOS zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikalen. Molekularbiologische Untersuchungen (RT-PCR) der Transplantate auf iNOS sollten zeigen, ob infiltrierende Makrophagen potentielle Effektorzellen darstellen. Native Peritonealmakrophagen sowie nicht-transplantierte Nebenschilddrüsen wiesen keine mRNA für iNOS auf (Abb. 4.16). Peritonealmakrophagen waren erst nach ihrer Aktivierung mit IFN- γ iNOS-positiv (Abb. 4.16). In allogenen Transplantaten waren von Tag 3 bis Tag 15 iNOS-positive Makrophagen nachzuweisen (vgl. Abb. 4.17). Hingegen wurden in syngenen Transplantaten über den gesamten Zeitraum keine iNOS-positiven Makrophagen beobachtet.

Durch die nachgewiesene Expression von iNOS mRNA während der akuten Transplantatabstoßung kommen die infiltrierenden Makrophagen als zytotoxische Effektorzellen bei der Abstoßung von Nebenschilddrüsentransplantaten in Frage.

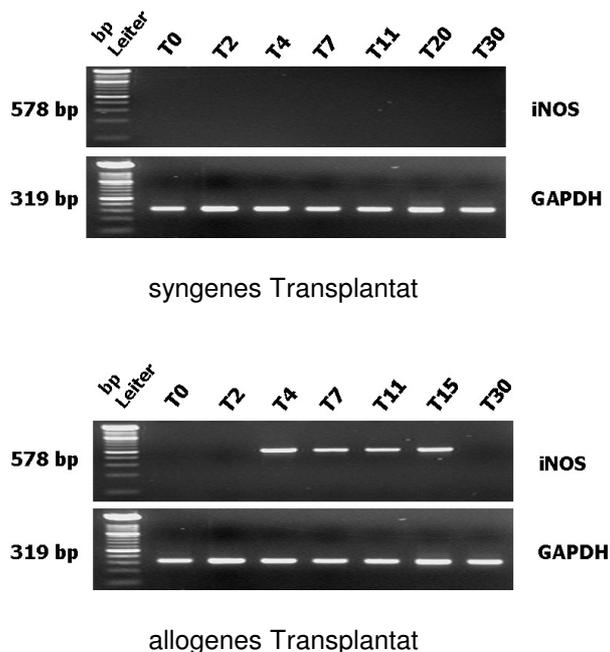


Abb. 4.17: Qualitativer Nachweis von iNOS Transkripten in syngen und allogenen transplantierten Nebenschilddrüsen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Syngene Nebenschilddrüsentransplantate weisen keine iNOS mRNA auf (obere Abbildung), während in allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten iNOS mRNA bis zur Transplantatabstoßung nachweisbar ist (untere Abbildung). Damit kommen die infiltrierenden Makrophagen als zytotoxische Effektorzellen bei der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate in Frage. Repräsentative Darstellung aus 2 untersuchten Tieren zu jedem Zeitpunkt (Tabelle A.5).

4.4 Untersuchungen zur Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate in sensibilisierten Tieren

4.4.1 Bestimmung von Transplantatfunktionszeiten

Bei den immunhistologischen Untersuchungen fiel auf, dass T-Lymphozyten vor allem die allogenen Nebenschilddrüsentransplantate infiltrierten. In syngen Transplantaten erschienen sie erst sehr spät am Tag 11 und waren nur bis Tag 20 nachweisbar. Nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation hingegen waren die T-Lymphozyten ab Tag 2 mit den Makrophagen die häufigsten Zellen im Transplantat. Weiterhin traten aktivierte CD25 positive T-Lymphozyten nur nach allogener Transplantation auf (Abb. 4.10 u. 4.11). Dies legt den Schluss nahe, dass die T-Lymphozyten bei der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate beteiligt sind. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden

LEW Ratten sieben Tage vor Transplantation mit dem allogenen Peptid P1 immunisiert. P1 ist ein Teil des MHC-Klasse-I-Moleküls der WF-Ratte und löst eine starke T-Zell-Antwort aus. P1-immunisierte LEW-Ratten stoßen zudem Herztransplantate der WF-Ratte beschleunigt ab.

In P1-immunisierten Lewis-Ratten waren die Transplantate nach $9,4 \pm 0,9$ Tagen destruiert (Tabelle 4.4), während die Zerstörung der Nebenschilddrüsentransplantate in nicht-immunisierten Lewis-Empfängern nach $15,8 \pm 1,8$ Tagen zu beobachten war (Tabelle 4.2 und Abb. 4.19). Diese Beschleunigung zeigte sich auch in der RT-PCR: PTH mRNA ließ sich bei P1-induzierter Abstoßung nur bis Tag 7 in den Epithelkörperchen nachweisen, während ohne P1-Immunsierung noch am Tag 11 PTH mRNA in den Epithelkörperchen nachweisbar war (vgl. Abb. 4.18).

Tabelle 4.4: Transplantatfunktionszeiten allogener Nebenschilddrüsen nach P1-Immunsierung (s. Kap. 3.6). Die Bestimmung der Funktionszeit erfolgte durch Messung des Serumkalziums zu unterschiedlichen postoperativen Zeitpunkten. Die Kalziumwerte der fünf Versuchstiere (P1-1 bis P1-5) sind in mmol/l angegeben. Als Abstoßungszeitpunkt ist der Tag angegeben, an dem das Serumkalzium wieder unter 2,0 mmol/l absinkt.

Tier	Tage postoperativ							Abstoßungszeitpunkt [Tag]
	0	4	5	7	9	10	11	
P1-1	1,8	2,0	2,1	2	1,9	1,6	-	9
P1-2	1,8	-	2,4	2,4	1,9	-	1,7	9
P1-3	1,6	-	2,2	2	1,6	-	-	9
P1-4	1,7	-	2,3	2,4	1,9	-	1,7	9
P1-5	1,6	-	2,4	2,4	2,1	-	1,4	11
Mittelwert:								9,4
Standardabweichung:								0,9

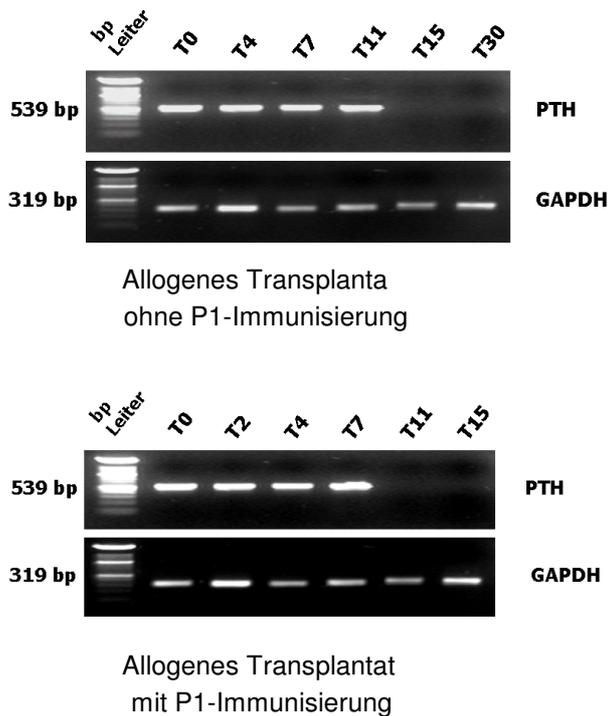


Abb. 4.18: Qualitativer Nachweis von PTH Transkripten in allogenen transplantierten Nebenschilddrüsen nach bzw. ohne P1-Immunisierung der Empfängertiere. Die Beschleunigung der Abstoßung lässt sich auch anhand der PTH mRNA nachweisen: Während bei der Abstoßung ohne P1-Immunisierung erst am Tag 15 keine PTH mRNA mehr nachweisbar ist, weisen Transplantate P1-immunisierter Tiere bereits am Tag 11 keine PTH mRNA mehr auf. Repräsentative Darstellung aus 2 untersuchten Tieren zu jedem Zeitpunkt (Tabelle A.5).

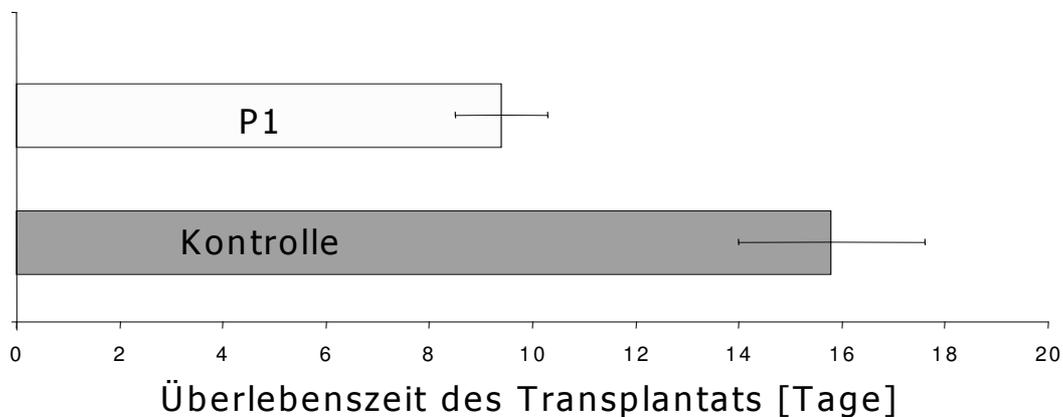


Abb. 4.19: Beschleunigte Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate nach Immunisierung der Empfängertiere mit dem allogenen Peptid P1. Transplantate der mit P1 sensibilisierten Tiere (P1) werden nach 9,4±0,9 Tagen abgestoßen (Tabelle 4.4), während nicht-sensibilisierte Tiere (Kontrolle) ihre Transplantate nach 15,8±1,8 Tagen verlieren (Tabelle 4.2).

4.4.2 Beschleunigte Transplantatabstoßung: Dynamik der zellulären Infiltration

Mit immunhistologischen Untersuchungen wurde nach Unterschieden bei der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate in P1-sensibilisierten LEW-Ratten und unbehandelten LEW-Ratten gesucht.

Das immunhistologische Bild allogener Nebenschilddrüsentransplantate nach Immunisierung mit P1 und ohne Immunisierung war nahezu identisch. Geringe Veränderungen wurden beim zeitlichen Verlauf der Infiltration mit Makrophagen und T-Lymphozyten festgestellt (Abb. 4.20 u. 4.21).

Bei den Analysen fiel auf, dass die T-Lymphozyten in P1-sensibilisierten Tieren bereits einen Tag früher in den allogenen Transplantaten nachweisbar waren als in nicht-sensibilisierten Tieren (Abb. 4.21). Dies verwundert nicht, da durch die Immunisierung zum Zeitpunkt der Transplantation bereits aktivierte T-Lymphozyten im Tier vorhanden waren und diese unverzüglich das Organ infiltrierten.

Nach Immunisierung mit P1 infiltrierten die Makrophagen deutlich stärker die allogenen Nebenschilddrüsentransplantate (Abb. 4.20, 4.22 u. 4.23). Bereits wenige Tage nach Transplantation war ein massives Infiltrat nachweisbar. Im Gegensatz dazu gelang in nicht-sensibilisierten Tieren die Beobachtung, wie sich die Makrophagen zuerst um das Transplantat sammelten, bevor sie dieses infiltrierten (Abb. 4.22, 4.23 u. 4.13).

Somit dominieren Makrophagen die Abstoßung von Nebenschilddrüsentransplantaten in sensibilisierten und nicht-sensibilisierten Tieren.

4 ERGEBNISSE

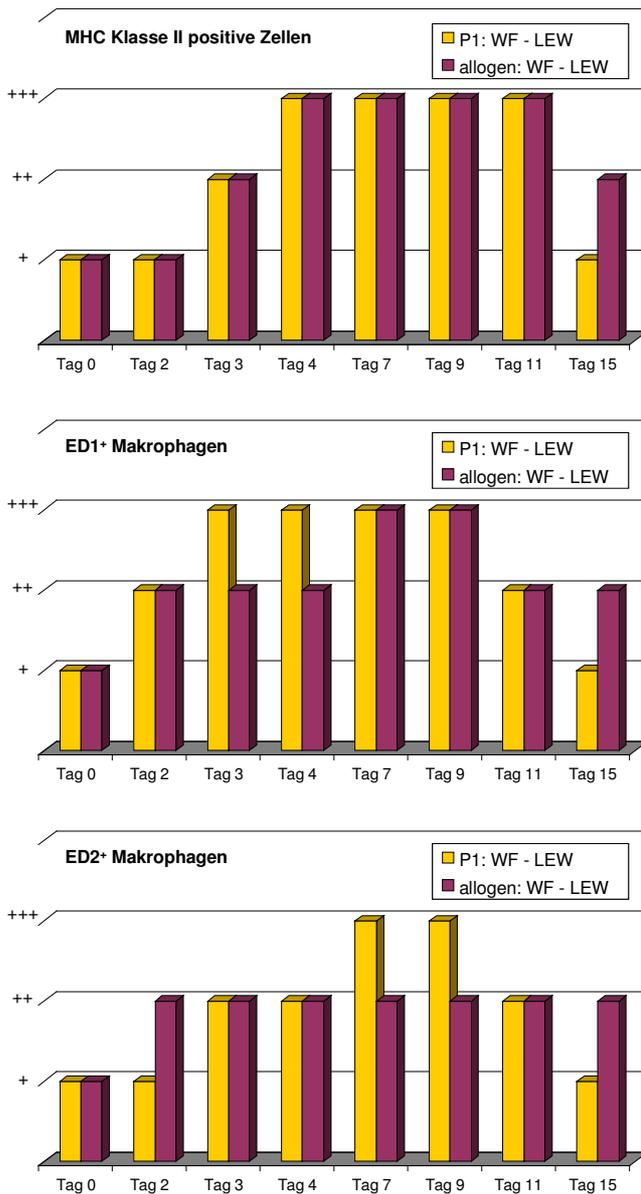


Abb. 4.20: Semiquantitative Auswertung der Infiltration von allogenen Nebenschilddrüsen-transplantaten nach bzw. ohne P1-Immunisierung. Gezeigt sind die Auswertungen der MHC-Klasse-II-positiven Zellen (oben), ED1⁺ Makrophagen (mitte) und ED2⁺ Makrophagen (unten). Immunhistologisch waren für diese Zellen kaum Unterschiede in der Infiltrationsstärke zwischen P1-immunisierten und nicht-immunisierten Tieren zu beobachten. Allein am Tag 3 und Tag 4 entstand der Eindruck, dass im sensibilisierten Tier die Infiltration des Transplantats durch Makrophagen frühzeitiger und stärker erfolgt (Abb. 4.22).

Zeichenerklärung:

- +++ >50% positive Zellen
- ++ 10%-50% positive Zellen
- + ≤ 10% positive Zellen

P1: LEW-Tiere wurden 7 Tage vor der Transplantation mit WF-Nebenschilddrüsen-transplantaten mit dem Peptid P1 immunisiert (Tab. 3.2).

Allogen: LEW-Tiere wurden vor der Transplantation mit WF-Nebenschilddrüsen-transplantaten nicht immunisiert (Tab. 3.2).

WF-LEW: „Transplantationsrichtung“. LEW-Tiere erhielten WF-Nebenschilddrüsen-transplantate (Tab. 3.2).

4 ERGEBNISSE

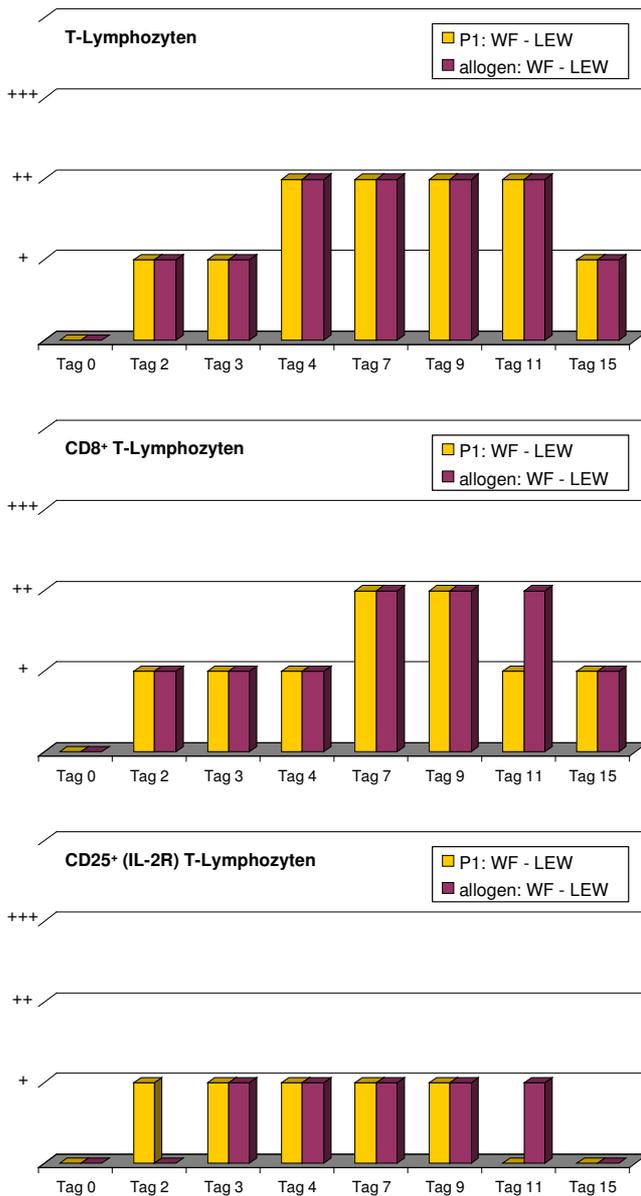


Abb. 4.21: Semiquantitative Auswertung der Infiltration allogener Nebenschilddrüsentransplantate mit T-Lymphozyten nach bzw. ohne P1-Immunisierung der Empfängertiere. Die T-Lymphozyten wurden mit dem anti-T-Zellrezeptor Antikörper R73 identifiziert (oben). Mit weiteren Antikörpern wurden die T-Lymphozyten in CD8-positive (mitte) sowie CD25-positive T-Lymphozyten unterteilt. Die Stärke der Infiltration mit T-Lymphozyten bei P1-immunisierten (P1: WF-LEW) Tieren unterscheidet sich nicht von nicht-immunisierten (allogen: WF-LEW) Tieren.

Zeichenerklärung:

- +++ >50% positive Zellen
- ++ 10%-50% positive Zellen
- + ≤ 10% positive Zellen

P1: LEW-Tiere wurden 7 Tage vor der Transplantation mit WF-Nebenschilddrüsentransplantaten mit dem Peptid P1 immunisiert (Tab. 3.2).

Allogen: LEW-Tiere wurden vor der Transplantation mit WF-Nebenschilddrüsentransplantaten nicht immunisiert (Tab. 3.2).

WF-LEW: „Transplantationsrichtung“. LEW-Tiere erhielten WF-Nebenschilddrüsentransplantate (Tab. 3.2).

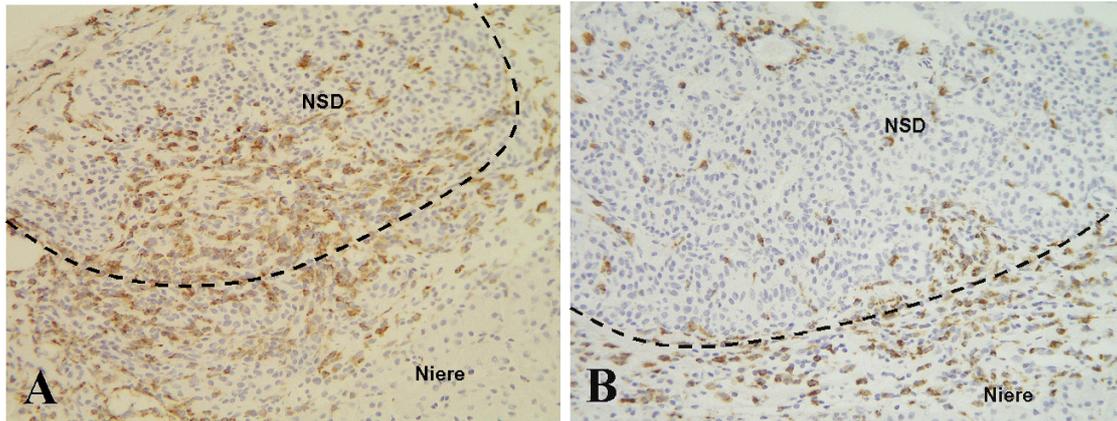


Abb. 4.22: Immunhistologischer Nachweis von Makrophagen in allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten nach (A) bzw. ohne (B) P1-Immunsierung der Empfängertiere. Es fällt auf, dass die Transplantate immunisierter Tiere bereits am Tag 3 massiv mit Makrophagen infiltriert sind (A), während zu diesem Zeitpunkt bei den Transplantaten unbehandelter Tiere erst der Organrand mit Makrophagen infiltriert ist und die Makrophagen dann erst später im Organ zu finden sind (Abb. 4.13). Repräsentative Färbung mit ED1 am Tag 3, Vergrößerung x200.

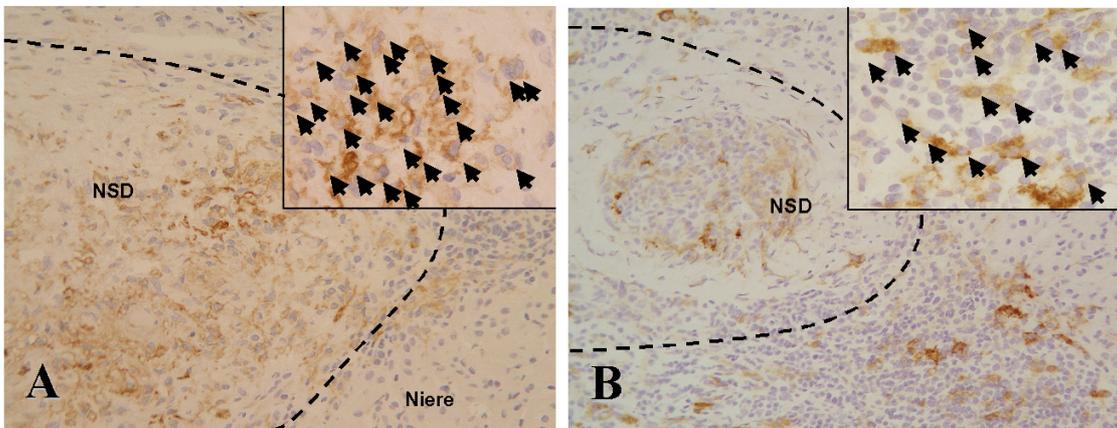


Abb. 4.23: Immunhistologischer Nachweis von Makrophagen in allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten nach (A) bzw. ohne (B) P1-Immunsierung der Empfängertiere. Am postoperativen Tag 9 ist in den allogenen Transplantaten ein stärkeres Makrophageninfiltrat nach Immunsierung mit P1 (A) zu finden als bei fehlender Immunsierung (B). In A sind zu diesem Zeitpunkt kaum noch Strukturen vom Transplantat zu finden. Repräsentative Färbung mit ED2 am Tag 9, Vergrößerung x200 und x400 (Insets).

4.4.3 Molekularbiologische Analysen Transplantat-infiltrierender Makrophagen

Die allogenen Transplantate aus P1-sensibilisierten Tieren wurden auf spezifische mRNA für kostimulatorische Moleküle und iNOS untersucht.

Expression kostimulatorischer Moleküle

Alle explantierten Transplantate aus P1-sensibilisierten Tieren waren zu den Beobachtungszeitpunkten positiv für CD40 und CD86 (Tabelle 4.5). CD80 ließ sich nur während der akuten Abstoßungsphase zwischen Tag 4 und Tag 9 in den Transplantaten nachweisen.

Tabelle 4.5: Qualitativer Nachweis von CD40, CD80 und CD86 mRNA (RT-PCR) in allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten. Alle explantierten Transplantate aus P1-immunisierten Tieren waren zu den Beobachtungszeitpunkten positiv für CD40 und CD86. CD80 ließ sich in den Transplantaten nur während der akuten Abstoßungsphase nachweisen: zwischen Tag 4 und Tag 9 in P1-immunisierten Tieren und zwischen Tag 4 und Tag 15 in nicht-immunisierten Tieren. Zu jedem Beobachtungszeitpunkt wurde das Transplantat von jeweils drei Tieren analysiert. Zur Ergebnisauswertung: Die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen im Agarsegel wurden wie folgt bewertet: 3 von 3 bzw. 2 von 3 positiv wurden mit (+) bewertet; 1 von 3 bzw. 0 von 3 positiv wurden mit (-) bewertet.

Untersuchungszeitpunkt [Tage]	allogene Transplantate mit P1-Immunsierung							allogene Transplantate ohne P1-Immunsierung								
	0	2	4	7	9	11	15	0	2	4	7	11	13	15	20	30
GAPDH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD40	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD86	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD80	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-

Expression von iNOS

In den explantierten allogenen Transplantaten P1-immunisierter Tiere war iNOS mRNA von Tag 3 bis Tag 9 in der RT-PCR nachweisbar (Abb. 4.24). Zum Vergleich: in nicht-immunisierten Tieren war iNOS mRNA von Tag 3 bis Tag 15 in den allogenen Transplantaten nachweisbar (Abb. 4.17).

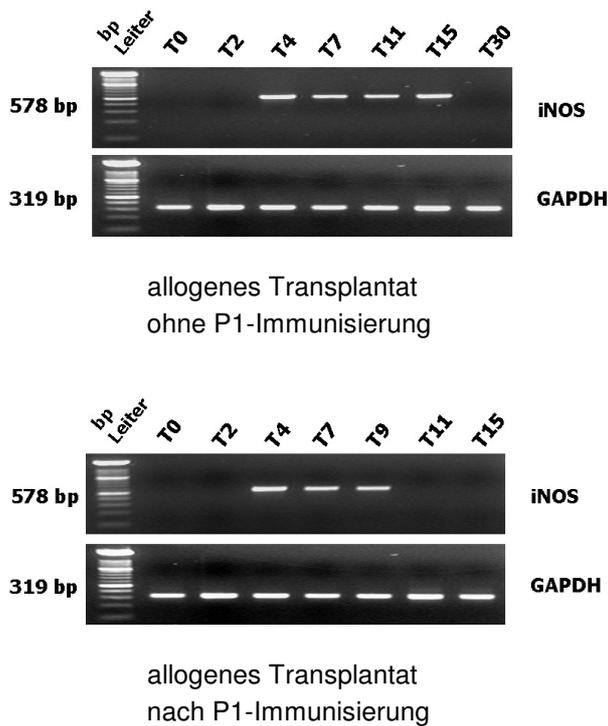


Abb.4.24: Qualitativer Nachweis von iNOS Transkripten mit der RT-PCR in allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten nicht-immunisierten und P1-immunisierten Tiere.

In nicht-immunisierten und immunisierten Tieren ist iNOS mRNA nur während der akuten Abstoßungsphase nachweisbar. Ohne P1-Immunisierung sind iNOS Transkripte in den allogenen Transplantaten bis Tag 15 nachzuweisen. In den Transplantaten P1-immunisierten Tiere hingegen sind iNOS Transkripte nur bis Tag 9 nachweisbar. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Transplantatfunktionszeiten (Tab. 4.2 und Tab. 4.4). Repräsentative Darstellung aus 2 untersuchten Tieren zu jedem Zeitpunkt (Tabelle A.5).

Schlussfolgerungen

Wie an syngenen Nebenschilddrüsentransplantaten beobachtet, stellt die Präsenz aktivierter (MHC-Klasse-II-positiv, Expression kostimulatorischer Moleküle) Makrophagen im Transplantat noch kein Indiz für eine Transplantatabstoßung dar. Hierzu scheinen iNOS-positive Makrophagen notwendig zu sein, die ihrerseits aktivierte T-Lymphozyten benötigen. Da iNOS-positive Makrophagen in syngenen Transplantaten nicht in Erscheinung treten, kommt es trotz eines massiven Makrophageninfiltrats nicht zur Abstoßung. In allogenen Transplantaten werden iNOS-positive Makrophagen im Beisein aktivierter T-Lymphozyten beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die MHC-Klasse-II-positiven Makrophagen von den aktivierten T-Lymphozyten möglicherweise entsprechende Signale erhalten, die die Expression des Enzyms iNOS induzieren. Aktivierte und iNOS-positive Makrophagen sind in der Lage, zellschädigende Substanzen, wie Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid herzustellen und wären somit potentielle Effektorzellen für die Transplantaterstörung.

5 Beantwortung der Fragen

1) Welche Auswirkungen haben die Parathyreoidektomie und die heterotop Transplantation von Nebenschilddrüsen auf die Regulation des Kalziumspiegels?

Nach Parathyreoidektomie fiel der Kalziumspiegel der operierten Lewis-Ratten in den hypokalzämischen Bereich unter 2,0 mmol/l. Zwei Nebenschilddrüsen-transplantate, die heterotop unter die Nierenkapsel hypokalzämischer Tiere transplantiert wurden, stellten den physiologischen Kalziumspiegel innerhalb einer Woche wieder her. Syngene Transplantate regulierten dauerhaft den Kalziumspiegel, während allogene Transplantate innerhalb von $15,8 \pm 1,8$ Tagen (s. Tabelle 4.2) vom Immunsystem der Transplantatempfänger zerstört wurden. Die Abstoßung war an einem erneuten Absinken des Kalziumspiegels unter 2,0 mmol/l festzustellen.

2) Welche zellulären Veränderungen zeigen sich im und um das Transplantat nach allogener und syngener Transplantation von Nebenschilddrüsen?

In syngenem Nebenschilddrüsen-transplantaten waren verschiedenste Immunzellen, wie MHC-Klasse-II-positive Makrophagen, Dendritische Zellen und NK-Zellen bereits ab Tag 4 nach Operation nachzuweisen. Zwischen Tag 11 und 20 erschienen ebenfalls T-Lymphozyten, die jedoch nicht aktiviert waren. Am Tag 30 hatte sich das Infiltrat nahezu vollständig aufgelöst, und die syngenem Transplantate wiesen keinerlei morphologische Schädigungen auf (Abb. 4.7, A+C).

Die immunhistologischen Ergebnisse (Kap. 4.3.2) nach allogener Nebenschilddrüsen-transplantation erlaubten die Einteilung in vier Phasen:

1. Unspezifische Entzündungsphase (Tag 0-2):
Das Infiltrat wird von MHC-Klasse-II-positiven Makrophagen und Dendritischen Zellen dominiert.
2. Infiltrationsphase (Tag 3-7):
Der Anteil an Makrophagen und Dendritischen Zellen im Infiltrat vergrößert sich und aktivierte (CD25-positive) T-Lymphozyten sowie MHC-

Klasse-II-positive Zellen, NK-Zellen und CD8-positive T-Lymphozyten sind nachweisbar.

3. Effektorphase (Tag 7-15):

Aktivierte T-Lymphozyten und MHC-Klasse-II- sowie iNOS-positive Makrophagen sind für diese Phase charakteristisch. Zudem manifestieren sich morphologische Zeichen der Zerstörung in den Transplantaten. Diese sind ab Tag 11 ödematös geschwollen und fibrotische Umbauprozesse setzen ein (Abb. 4.5). Zusätzlich ist am Tag 15 keine mRNA für PTH mehr nachzuweisen (Abb. 4.4).

4. Umbauphase (Tag 15-30)

Nach der Zerstörung der Nebenschilddrüsentransplantate bildet sich eine fibröse Reststruktur aus, und das Infiltrat löst sich bis Tag 30 nahezu vollständig auf.

3) T-Lymphozyten und Makrophagen sind wichtige Effektorzellen bei der Abstoßung vaskularisierter Organtransplantate. Sind diese Immunzellen auch an der Zerstörung primär nicht-vaskularisierter Nebenschilddrüsentransplantate beteiligt?

An der Abstoßung primär nicht-vaskularisierter Nebenschilddrüsentransplantate sind alloreaktive T-Lymphozyten beteiligt. Durch ihre gezielte Aktivierung mit dem allogenen Peptid P1 wird der Abstoßungszeitpunkt von $15,8 \pm 1,8$ Tagen (Tabelle 4.2) auf $9,4 \pm 0,9$ Tage (Tabelle 4.4) verkürzt. Hieran sind ebenfalls MHC-Klasse-II- sowie iNOS-positive Makrophagen beteiligt. Mit Hilfe des Enzyms iNOS (induzierbare NO-Synthetase) produzieren sie das zellschädigende Stickstoffmonoxid oder NO. Zwar wurde die Produktion von NO in dieser Arbeit nicht bestimmt, doch korreliert der Nachweis von iNOS mRNA mit der beobachteten Zerstörung der allogenen Transplantate, während syngene Transplantate stets frei von iNOS-positiven Makrophagen waren.

Die Daten dieser Arbeit lassen somit den Schluss zu, dass aktivierte T-Lymphozyten notwendig sind, um die iNOS-Expression in Makrophagen zu induzieren.

6 Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den zellulären Vorgängen bei der Abstoßung von Nebenschilddrüsentransplantaten im Kleintiermodell Ratte. Hierbei wurde insbesondere die Beteiligung von T-Lymphozyten und Makrophagen an der Zerstörung der Nebenschilddrüsen untersucht. Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass die in das Transplantat einwandernden Makrophagen neben ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation auch als Effektorzellen an der Transplantatzerstörung beteiligt sind. Gesteuert wird dies durch aktivierte allogene T-Lymphozyten.

6.1 Aktueller Stand der allogenen Nebenschilddrüsentransplantation

Zahlreiche Versuche wurden unternommen, die allogene Nebenschilddrüsentransplantation klinisch zu etablieren. Noch 1959 behauptete Russel, dass die kleinen endokrinen Organe geringer immunogen seien als die großen soliden Organe und wagte deshalb die Vorhersage, dass die klinische Nebenschilddrüsentransplantation kurz vor ihrer Realisierung stünde (Russell und Gittes, 1959). Dieser Optimismus scheiterte jedoch an der „immunologischen Realität“. Die kleinen Nebenschilddrüsen werden ebenso heftig abgestoßen wie die großen soliden Organe. Nur die dauerhafte Einnahme nebenwirkungsreicher Immunsuppressiva kann dies verhindern bzw. verzögern. Aus diesem Grund werden allogene Nebenschilddrüsentransplantationen auch nur in solchen Fällen durchgeführt, in denen der hypoparathyreoide Patient bereits transplantiert ist und er daher ohnehin Immunsuppressiva erhält (Duarte et al., 1985; Alfrey et al., 1992).

Um die Abstoßung allogener Nebenschilddrüsen ohne dauerhafte Immunsuppression zu verhindern, wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Hierzu gehören: (1) kurzzeitige Immunsuppression, (2) Reduktion der Transplantat-Immunogenität durch Depletion der „passenger

leukocytes" (siehe Einleitung) und (3) Schutz des Transplantats vor dem Empfängerimmunsystem durch Immunisolation.

Im Folgenden werden die eigenen Ergebnisse zu den ersten beiden experimentellen Verfahren mit publizierten Daten verglichen. Zum 3. experimentellen Verfahren wird eine kurze Übersicht über den aktuellen Stand gegeben:

(1) Kurzzeitige Immunsuppression. Mit einer drei Tage vor Transplantation verabreichten kurzzeitigen Immunsuppression verlängerte Bloom das Überleben von Nebenschilddrüsentransplantaten im Tierexperiment von 28 Tagen auf eine mediane Überlebenszeit von 80,5 Tagen. Hierzu wurden die „passenger leukocytes" vor Transplantation depletiert (Bloom et al., 1987). Diese viel versprechenden Ergebnisse ließen sich jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht wiederholen. Auch die eigene Arbeitsgruppe beschäftigte sich experimentell mit diesem Thema. So wurde mit einer täglichen Dosis von 20 mg/kg Ciclosporin A, verabreicht über 14 Tage, eine geringfügige Verlängerung des Transplantatüberlebens von 13 ± 2 Tage auf 28 ± 3 Tage erreicht (Timm et al., 2004). Mit der gleichen Dosis wurde das Transplantatüberleben für hoch-immunogene Dünndarmtransplantate auf 165 ± 21 Tagen verlängert. Zum Vergleich: Ohne Immunsuppression ist die Abstoßung der orthotop transplantierten Dünndarmtransplantate bereits am Tag 6 so weit fortgeschritten, dass die Versuche hierzu abgebrochen wurden.¹ Diese Daten belegen eindrucksvoll, warum Russel mit seiner Vorhersage scheitern musste. Allogene Nebenschilddrüsentransplantate benötigen wie solide Organe eine dauerhafte Immunsuppression. Gegenwärtig ist jedoch nicht geklärt, ob die fehlende Vaskularisierung das unzureichende Ergebnis der immunsuppressiven Therapie erklärt. Auch ist vorstellbar, dass Makrophagen von der Immunsuppression weniger stark beeinträchtigt werden. Werden sie nämlich z.B. mit Clodronat depletiert, so ist eine deutliche Verlängerung des Transplantatüberlebens von vaskularisierten und nicht-vaskularisierten

¹ Sowohl die Transplantation der Nebenschilddrüsen als auch der Dünndärme wurde in der Stammkombination Wistar Furth nach Lewis durchgeführt.

Transplantaten zu beobachten (Jose et al., 2003; Yi et al., 2003; Slegers et al., 2004).

(2) Reduktion der Transplantat-Immunogenität. Bei der Reduktion der Transplantat-Immunogenität werden die „passenger leukocytes“ durch Kultivierung der Nebenschilddrüsen depletiert und somit die direkte Alloantigenerkennung unterbunden (Kap. 1). Die Daten dieser Arbeit belegen, dass in erster Linie Makrophagen als „passenger leukocytes“ in Frage kommen (Tabelle 4.1). In anderen Tiermodellen wie Maus und Hamster wurden ebenfalls Makrophagen in den Nebenschilddrüsen nachgewiesen (Hume et al., 1984; Chen et al., 1999). Während die *in vitro* Kultivierung von Schilddrüsen (Lafferty et al., 1976) und Pankreas-Inselzellen (Lacy et al., 1979) vor ihrer Transplantation zu eindeutig längeren Funktionszeiten *in vivo* führt, scheint die Kultivierung von Nebenschilddrüsen weniger erfolgreich zu sein (Raaf et al., 1974; Naji et al., 1981). Auch die eigenen Daten sprechen hierfür: So sind auch nach zwei Wochen in Kultur weiterhin Makrophagen immunhistochemisch in den Nebenschilddrüsen der Ratte nachzuweisen (Daten im Anhang). Zudem war diese *in vitro* Kultivierung für die Nebenschilddrüsen sehr schädigend, was an den zahlreichen Nekrosen in den Organen zu beobachten war (Abb. A.2 im Anhang). Dies führte dazu, dass nur 50% der *in vitro* kultivierten Transplantate auch eine Funktion *in vivo* zeigten. Berichte anderer Arbeitsgruppen bestätigen diese Ergebnisse. So versagten bei Naji et al. 32% der *in vitro* kultivierten humanen Nebenschilddrüsentransplantate *in vivo* (Naji et al., 1981). Aus diesem Grund optimierten Tolloczko et al. die Kulturbedingungen für humane Nebenschilddrüsen mit dem Erfolg, dass sich die Transplantatüberlebenszeit auf maximal 14 Monate *in vivo* verlängerte (Tolloczko et al., 1996). Trotz dieser Fortschritte bei den Kultivierungsbedingungen bleibt doch die Überlebenszeit humaner Nebenschilddrüsen im Patienten im Durchschnitt auf ein Jahr begrenzt (Tolloczko et al., 1997). Mit solchen Transplantatfunktionszeiten ist ein klinischer Einsatz wenig sinnvoll.

(3) Immunisolaton. Eine weitere Methode, die Transplantatabstoßung zu verhindern, ist die Immunisolaton. Hierzu werden die Nebenschilddrüsen mechanisch zerkleinert und die Gewebepartikel mit biokompatiblen Materialien, z.B. Alginaten, verkapselt (Hasse et al., 1997; Hasse et al., 2000; Moskalenko V, 2004). Diese semipermeable Alginatkapsel schützt das Transplantat vor dem Immunsystem des Empfängers, da die „Poren“ für Immunzellen und Antikörper nicht groß genug sind. Kleine Moleküle, wie Sauerstoff und Glukose, passieren die Barriere jedoch ungehindert. Seit zwei Jahrzehnten wird diese Methode kontinuierlich optimiert (Pattou et al., 1998), doch überzeugen die klinischen Erfolge zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht (Tibell et al., 2001). Trotzdem lassen die sehr erfolgreichen Tierexperimente Grund zur Hoffnung, dass diese Technik eines Tages doch Eingang in die Klinik finden wird (Hasse et al., 2000). Das wesentliche Problem der Immunisolaton besteht darin, dass die verkapselten Transplantate nach einiger Zeit von Fibroblasten umlagert werden, wodurch der Stoffaustausch so massiv einschränkt wird, dass die Zellen in der Kapsel absterben (Anderson, 1988; Colton, 1995).

Die hier aufgelisteten experimentellen Strategien können somit die Transplantatfunktion im Tierexperiment verlängern. Alle drei Strategien bieten Lösungsansätze für das immunologische Problem, die Transplantatabstoßung ohne Nebenwirkungen zu verhindern. Doch überrascht es, dass in keiner der bisherigen Studien über Nebenschilddrüsentransplantation die Abstoßung detailliert untersucht wurde. Entweder wurden in diesen Studien die Organe ausschließlich in der Histologie beurteilt oder zu Zeitpunkten analysiert, wo die Organe bereits vollständig abgestoßen und fibrosiert waren. Doch erst das Wissen um die zellulären Vorgänge bei der Abstoßung kann neue Wege aufzeigen, wie diese Immunantwort zu blockieren ist, um allogene Nebenschilddrüsentransplantate langfristig ohne Immunsuppression zu erhalten.

6.2 Verlauf der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate

In diesem Kapitel werden wichtige Phasen der Abstoßung -- sowohl antigen-unabhängige als auch antigenabhängige -- betrachtet und die eigenen Ergebnisse hierzu mit der aktuellen Literatur diskutiert.

Ischämie und immunologische Vorgänge. Bei der Übertragung von Organtransplantaten kommt es regelmäßig zu einer Schädigung der Transplantate durch mangelnde Versorgung mit Nährstoffen in der ischämischen Phase (Penfield et al., 1999). Während vaskularisierte Transplantate nach dem Gefäßanschluss sofort mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden, erhalten primär nicht-vaskularisierte Transplantate bis zu ihrer Revaskularisierung Nährstoffe und Sauerstoff ausschließlich über Diffusion. Diese Minderversorgung führt zu einem Zelluntergang in den Organen. In dieser hypoxischen Situation werden proinflammatorische Zytokine wie RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*) und MIP-1 (*macrophage inflammatory protein*) sowie Mediatoren zur Förderung der Angiogenese freigesetzt (Melter et al., 1999). So wurde für Nebenschilddrüsentransplantate nachgewiesen, dass ihre Zellen in erster Linie den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sezernieren, um so eine Anbindung an das Gefäßsystem zu erreichen (Carter et al., 2000). Dabei ist VEGF wohl nicht nur an der Angiogenese wesentlich beteiligt, sondern ist wie RANTES, MCP-1 und MIP-1 als proinflammatorisches Zytokin bekannt, das dafür sorgt, dass Immunzellen in das Entzündungsgebiet einwandern (Reinders et al., 2003).

Insbesondere diese Eigenschaft des VEGF und anderer proinflammatorischer Zytokine könnte die in dieser Arbeit beobachtete rasche und intensive Infiltration der syngenen, aber auch allogenen Transplantate mit Makrophagen, MHC-Klasse-II-positiven Zellen und Dendritischen Zellen erklären (vgl. Kap. 4.3.2). In syngenen Transplantaten löste sich dieses Infiltrat ab Tag 30 nach Transplantation auf. Zudem blieb eine Aktivierung von T-Lymphozyten aus. Zwar wurden in den syngenen Transplantaten T-Lymphozyten nachgewiesen, jedoch waren

diese, im Gegensatz zu den T-Lymphozyten in allogenen Transplantaten, nicht aktiviert (Abb. 4.10 u. 4.11).

Interaktion zwischen Makrophagen und T-Lymphozyten. Nach den experimentellen Daten dieser Arbeit werden folgende Phasen bei der Abstoßung postuliert: Makrophagen werden durch Entzündungsmediatoren, die in erster Linie durch den chirurgischen Eingriff freigesetzt werden, aktiviert und wandern massiv in die Nebenschilddrüsentransplantate ein. Dies ist sowohl in syngenen als auch allogenen Transplantaten zu beobachten. Aktivierte Makrophagen exprimieren MHC-Klasse-II-Moleküle und auch kostimulatorische Moleküle, was molekularbiologisch in dieser Arbeit durch den Nachweis spezifischer mRNA für CD40 und CD86 gezeigt wurde (Tabelle 4.3 u. Abb. 4.16). Aktivierte Makrophagen verfügen über Eigenschaften antigenpräsentierender Zellen und können alloreaktive T-Lymphozyten aktivieren (Gordon, 2003).

Eine in dieser Arbeit nicht untersuchte Frage ist, wo alloreaktive T-Lymphozyten aktiviert werden: im Transplantat oder in peripheren Lymphknoten. Wird eine T-Zell-Aktivierung im Transplantat vorausgesetzt, so ist zu erklären, wie naive T-Lymphozyten in das Transplantat gelangen. Naive und Effektor T-Lymphozyten exprimieren unterschiedliche Oberflächenmoleküle, die ihnen erlauben, entweder über hochendotheliale Venolen in die Lymphknoten oder über aktiviertes vasculäres Endothel in das Transplantat einzuwandern (Ley und Kansas, 2004). Naive T-Lymphozyten wandern zwischen Peripherie und Lymphknoten (Abb. 6.1). In den Lymphknoten werden ihnen durch Dendritische Zellen, aber auch durch aktivierte Makrophagen, Antigene präsentiert (Itano und Jenkins, 2003). Erkennt ein naiver T-Lymphozyt mit seinem T-Zell-Rezeptor sein Antigen in MHC-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen und erhält er noch zusätzlich kostimulatorische Signale, so kommt es zu seiner Aktivierung. Neben dem Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R, CD25) exprimieren diese Zellen auch Adhäsionsmoleküle, wie VLA-4 oder LFA-1, die ihnen die gerichtete Einwanderung in das Transplantat ermöglichen (Madri et al., 1996; Yang und Hagmann, 2003). Aktivierte CD25-positive T-Lymphozyten wurden erstmals am Tag 3 in allogene-

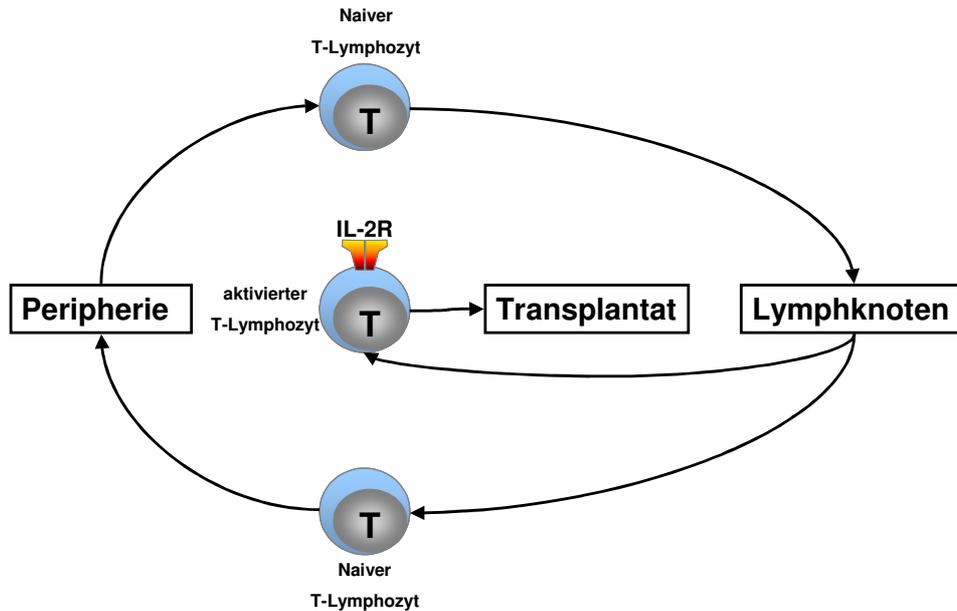


Abb. 6.1: Naive T-Lymphozyten zirkulieren zwischen Peripherie und Lymphknoten. Naive T-Lymphozyten werden durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert, indem sie über ihren T-Zell-Rezeptor das ihnen präsentierte Antigen in Kombination zusätzlicher kostimulatorischer Signale erkennen. Danach exprimieren die aktivierten T-Lymphozyten den Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R, CD25) sowie Adhäsionsmoleküle. Jetzt können sie in ihr Zielgewebe, wie beispielsweise das Nebenschilddrüsen-Transplantat, einwandern.

nen Nebenschilddrüsen-Transplantaten nachgewiesen. Aktivierte T-Lymphozyten sezernieren zudem verschiedenste Zytokine wie z. B. $\text{TNF-}\alpha$, RANTES (s. oben) und $\text{IFN-}\gamma$ (Nadeau et al., 1995; Melter et al., 1999; Rocha et al., 2003). Vor allem RANTES führt zur Rekrutierung weiterer T-Lymphozyten und Makrophagen (Yun et al., 2001). Dies könnte die in dieser Arbeit beobachtete massive Infiltration von Makrophagen sowie weiterer T-Lymphozyten nach dem Auftreten erster aktivierter T-Lymphozyten in allogenen Nebenschilddrüsen-Transplantaten erklären (Abb. 4.10, 4.11, 4.12 u. 4.13).

Dass alloreaktive T-Lymphozyten bevorzugt in peripheren Lymphknoten aktiviert werden, konnte die Arbeitsgruppe um Lakkis zeigen. Sie benutzten a-lymphatische Mäuse (*aly/aly*), die keine Lymphknoten und keine Peyer-Plaques besitzen. Nach zusätzlicher Splenektomie waren diese Mäuse nicht mehr fähig, allogene Organtransplantate abzustossen. Dies wurde damit erklärt, dass den

zirkulierenden T-Lymphozyten die entsprechenden Orte (Lymphknoten, Milz) fehlen, um mit Alloantigenen in Kontakt zu kommen (Lakkis et al., 2000).

Im Gegensatz dazu wurde in einem anderen Experimentalmodell durch Zhou et al. beobachtet, dass Lymphknoten und Milz nicht unbedingt für die Abstoßung allogener Transplantate notwendig sind. Besondere knockout-Mäuse, die unfähig sind, Lymphknoten und Peyer-Plaques auszubilden, wurden splenektomiert. Diese Mäuse waren trotz fehlendem lymphatischen Gewebe in der Lage, allogene Organtransplantate, wenn auch verzögert, abzustoßen. Diese Beobachtung wurde damit erklärt, dass eine intraorganische Aktivierung naiver T-Lymphozyten existieren muss (Zhou et al., 2003). Als weiteren Hinweis für eine intraorganische Aktivierung fanden Jones et al. bei der Abstoßung nicht-vaskularisierter Haut- und Pankreasinseltransplantate keine aktivierten T-Lymphozyten in den lokalen Lymphknoten (Jones et al., 2001).

Somit wäre auch eine intraorganische Aktivierung naiver T-Lymphozyten in den Nebenschilddrüsentransplantaten denkbar. Der experimentelle Beweis steht zwar noch aus, doch wurden in dieser Arbeit nicht-aktivierte T-Lymphozyten in syngenen und allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten nachgewiesen (vgl. Kap. 4.3.2). Dies deutet darauf hin, dass T-Lymphozyten möglicherweise nicht zwangsläufig in der Peripherie aktiviert werden müssen, um Nebenschilddrüsentransplantate zu infiltrieren.

INOS-positive Makrophagen als Effektorzellen. Nicht nur in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Makrophagen mit der Expression kostimulatorischer Moleküle, wie CD80, CD86 und CD40, auf ihrer Oberfläche einhergeht. Auch nach allogener Lungentransplantation wiesen Nicod et al. kostimulatorische Moleküle auf Alveolarmakrophagen nach (Nicod et al., 2005). Wie Bingaman et al. zeigten, werden CD40-positive Makrophagen durch CD40L-positive T-Lymphozyten zur Produktion von iNOS angeregt (Bingaman et al., 2000). Diese Vorstellung lässt sich anhand der vorliegenden eigenen Daten nachvollziehen: Die allogene und syngene Nebenschilddrüsentransplantate in-

filtrierenden Makrophagen waren CD40 positiv (molekularbiologischer Nachweis von CD40 mRNA). Jedoch nur die Anwesenheit aktivierter T-Lymphozyten, die stets CD40L exprimieren (Armitage et al., 1992; Lederman et al., 1992), führte dazu, dass iNOS-positive Makrophagen ausschließlich in den allogenen Transplantaten nachzuweisen waren (Abb. 6.2).

Durch die Expression von iNOS sind Makrophagen in der Lage, aggressive zytotoxische Sauerstoffradikale sowie NO und TNF- α zu produzieren (Le Moine et al., 2002). Nur während des Auftretens aktivierter T-Lymphozyten im Transplantat ließ sich auch eine Expression von iNOS auf mRNA-Ebene in Makrophagen nachweisen (Kap. 4.3.3). Auch Alexander et al. zeigten eine Expression von iNOS ausschließlich nach allogener und nicht nach syngener Herztransplantation (Alexander et al., 1996). Damit kann davon ausgegangen werden, dass aktivierte T-Lymphozyten eine regulatorische Funktion auf aktivierte Makrophagen ausüben. Wenn auch in dieser Arbeit nicht gezeigt, so ist doch davon auszugehen, dass es sich bei den aktivierten T-Lymphozyten um CD4+ Zellen handelt. In Abbildung 6.2 sind die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sowie der Zusammenhang zwischen aktivierten CD4+ T-Lymphozyten und der Expression von iNOS in Makrophagen graphisch dargestellt.

Interaktion zwischen Makrophagen und T-Lymphozyten: abschließende Betrachtung. Die oftmals beschriebene Bedeutung der „passenger leukocytes“ für die Induktion der Transplantatabstoßung konnte in der vorliegenden Arbeit für Nebenschilddrüsentransplantate nicht bestätigt werden. Damit scheint der direkte Weg der Alloantigenerkennung (s. Einleitung) nicht die große Bedeutung für die Transplantatabstoßung zu haben, wie vor Beginn der Arbeit vermutet. Vielmehr wird dem Zusammenspiel zwischen Makrophagen und T-Lymphozyten eine größere Bedeutung bei der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate zugesprochen. Hierfür müssen aktivierte T-Lymphozyten und Makrophagen im Transplantat präsent sein. Das entscheidende Ereignis, das Makrophagen zu Effektorzellen werden lässt, ist die Induktion der iNOS-Expression (Abb. 6.2 und 6.3), vermutlich mit Hilfe aktivierter T-Lymphozyten. Mit iNOS produzieren

Makrophagen zytotoxische Moleküle, wie NO und Sauerstoffradikale, die schließlich die Zellen des Transplantats Antigen-unabhängig zerstören (Abb. 6.3).

Syngene Nebenschilddrüsentransplantate werden deshalb nicht von aktivierten (MHC-Klasse-II-positiven) Makrophagen antigenunabhängig zerstört, weil diese Makrophagen nicht in der Lage sind, iNOS zu exprimieren. Die hierfür notwendigen aktivierten T-Lymphozyten fehlen in den syngenem Transplantaten, da das adaptive Immunsystem bei dieser Art der Transplantation nicht aktiviert wird (Abb. 6.2 und 6.3).

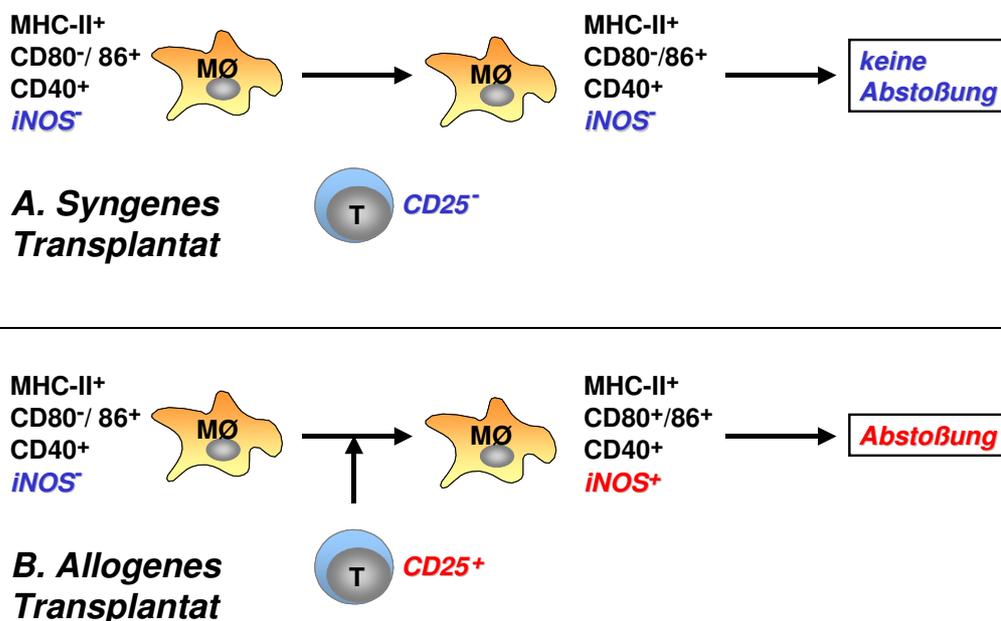


Abb. 6.2: Der mögliche Zusammenhang zwischen aktivierten (CD25+) T-Lymphozyten und der iNOS-Expression in Makrophagen. In syngenem Transplantaten sind iNOS-negative, MHC-Klasse-II-positiv, CD86-positiv und CD40-positiv Makrophagen als auch CD25-negative T-Lymphozyten nachzuweisen (A). Unter diesen Bedingungen erfolgt keine Abstoßung (A). Mit dem Auftreten alloreaktiver CD25-positiver T-Lymphozyten in allogenen Transplantaten werden die Makrophagen positiv für iNOS. Unter diesen Bedingungen werden die Transplantate abgestoßen (B). Inwieweit der Nachweis von CD80 mit der iNOS-Expression in einem Zusammenhang stehen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beurteilt werden.

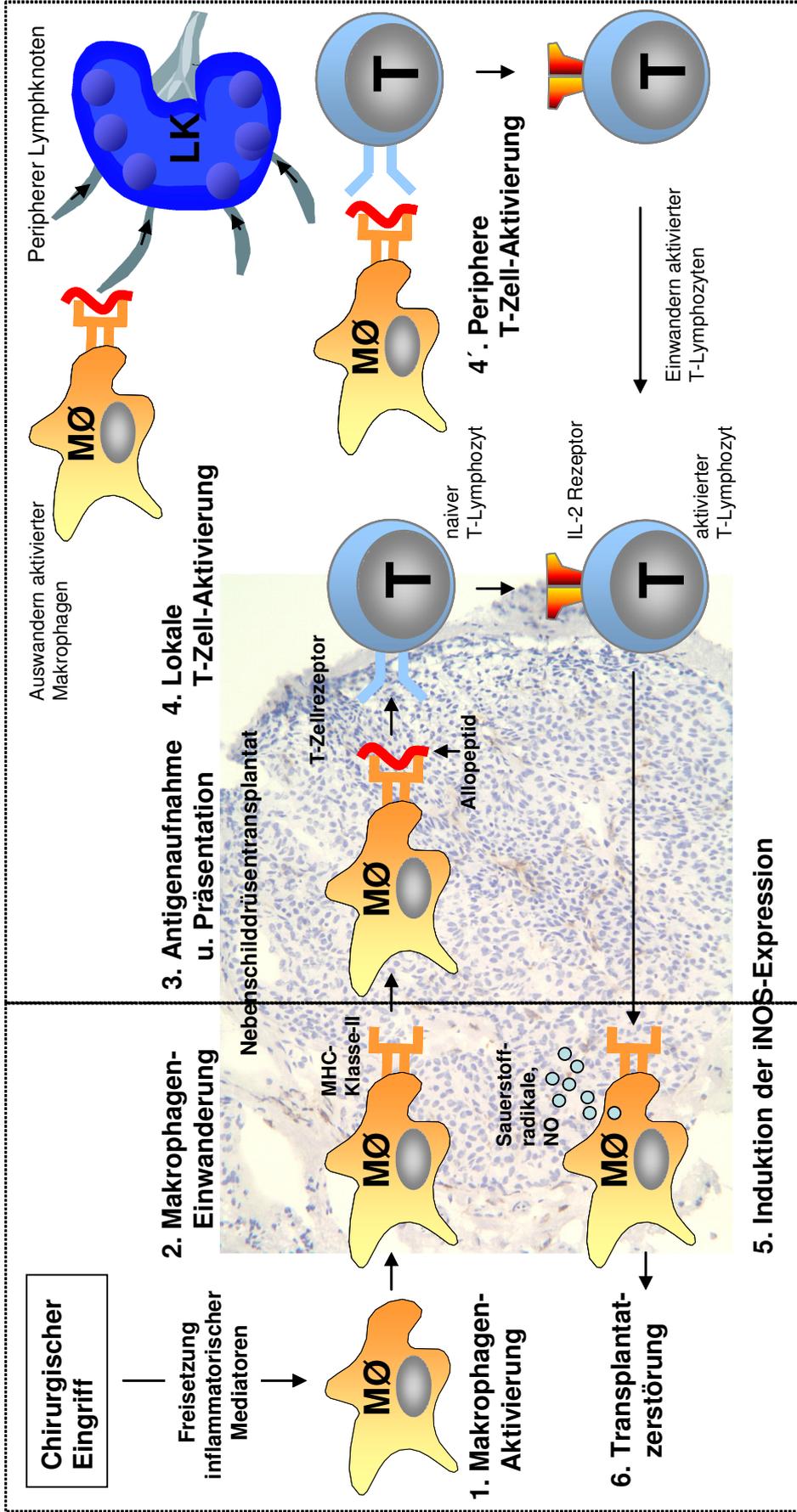


Abb. 6.3 auf Seite 62: Die aus den experimentellen Daten dieser Arbeit abgeleitete Arbeitshypothese zur Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate. Als wesentlich hierfür wird die Interaktion zwischen Makrophagen und T-Lymphozyten gesehen. Der unvermeidliche chirurgische Eingriff führt zur Antigen-unabhängigen Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems. Dies erklärt auch die massive Infiltration syngener Transplantate mit aktivierten Makrophagen (Abb. 4.12 und 4.13). Entscheidend für die Induktion der Abstoßung ist jedoch die Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten. Da nach syngener Transplantation keine T-Lymphozyten aktiviert werden, hat das massive Infiltrat aktivierter Makrophagen keine funktionellen Auswirkungen und löst sich nach wenigen Wochen spontan auf. In allogenen Transplantaten lösen aktivierte Makrophagen vermutlich die Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten aus. Momentan ist nicht geklärt, ob diese Aktivierung im Transplantat (lokale T-Zell-Aktivierung) oder in den peripheren Lymphknoten stattfindet (periphere T-Zell-Aktivierung). Bei der lokalen Aktivierung müssen naive T-Lymphozyten in das Transplantat einwandern, während bei der peripheren Aktivierung aktivierte T-Lymphozyten das Transplantat aufsuchen. Die Präsenz aktivierter T-Lymphozyten hat zur Folge, dass aktivierte Makrophagen das Enzym iNOS exprimieren, das ihnen erlaubt, zelltoxische Sauerstoffradikale sowie Stickstoffmonoxid zu produzieren. Wie die Interaktion zwischen aktivierten Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten im Detail aussieht, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. Die Schlussfolgerung aus dieser Arbeitshypothese ist, dass ein Infiltrat aktivierter, jedoch iNOS-negativer Makrophagen keine Transplantatabstoßung auslöst. Dies ist in weiteren Experimenten zu zeigen.

Die Transplantation allogener Nebenschilddrüsen ohne lebenslange Immunsuppression bleibt auch weiterhin im experimentellen Stadium. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse tragen wesentlich zum Verständnis bei, wie allogene Nebenschilddrüsentransplantate zumindest im Experimentalmodell zerstört werden. Diese Erkenntnisse könnten auch von klinischer Relevanz sein.

7. Ausblick

Zwar handelt es sich bei der Transplantatabstoßung um eine von T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort (Medawar, 1944), doch sind auch Makrophagen als Effektorzellen beteiligt.

Makrophagen übernehmen als Zellen des angeborenen Immunsystems eine wichtige Funktion bei der natürlichen Abwehr. Der klassische Aktivierungsweg von Makrophagen ist durch eine erhöhte Produktion an Stickstoffmonoxid (NO) und proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α) charakterisiert. Diese Makrophagen, die hauptsächlich durch LPS aktiviert werden, sind an entzündlichen Vorgängen wie der Eliminierung von Pathogenen und Gewebedestruktion als Folge akuter und chronischer Inflammation beteiligt. Dieser Typ von Makrophage, der MHC-Klasse-II-Moleküle und kostimulatorische Moleküle exprimiert, ist auch in abgestoßenen Nebenschilddrüsentransplantaten nachzuweisen. Ein nächster Schritt wäre deshalb, die infiltrierenden Makrophagen weiter zu charakterisieren und die Produktion an NO zu bestimmen.

In weiterführenden Experimenten sollte die Zytotoxizität der iNOS-positiven Makrophagen zunächst *in vitro* und später auch *in vivo* bestimmt werden. Hierzu würden iNOS-positive Makrophagen mit allogenen Zellen inkubiert, um die Vitalität der allogenen Zielzellen als Maß der Zytotoxizität zu überprüfen. Zudem könnten in einem weiteren Schritt die Makrophagen mit Clodronate-Liposomen selektiv depletiert werden, um die Auswirkung dieser Depletion auf die Transplantatfunktion zu überprüfen.

Ebenfalls hochinteressant wäre es zu überprüfen, ob tolerogene T-Lymphozyten in der Lage sind, infiltrierende Makrophagen als wesentliche Effektorzellen zu inaktivieren.

8. Zusammenfassung

Der permanente Hypoparathyreoidismus ist charakterisiert durch eine unzureichende Produktion des Peptidhormons Parathormon. Die häufigste Ursache für einen Hypoparathyreoidismus sind Operationen im Halsbereich. Nach Schätzungen des Statistischen Bundesamtes kommen allein in Deutschland jährlich 500-4000 Neuerkrankungen hinzu. Die aus Kalzium und Vitamin D-Analoga bestehende Standardtherapie kann den Kalziumverlust durch die Niere nicht verhindern. Langfristig führt diese chronische Hyperkalzurie zur Niereninsuffizienz. Die bei anderen Hormonmangel-Erkrankungen wie Nebenniereninsuffizienz, Hypothyreose und Diabetes mellitus sehr erfolgreiche Hormonsubstitution befindet sich bei der Behandlung des Hypoparathyreoidismus noch im experimentellen Stadium.

Ein Sonderfall der Hormonsubstitution stellt die Transplantation dar. Durch die Übertragung von Nebenschilddrüsengewebe wird die tagesrhythmische Parathormonsekretion wiederhergestellt. Im Gegensatz zur Autotransplantation, bei der nach Schilddrüsenoperationen Teile der eigenen Nebenschilddrüse vom Halsbereich in die Unterarmmuskulatur verlegt werden, kommt es bei der Allogotransplantation (hier sind Transplantat und Empfänger genetisch nicht identisch) zur gefürchteten Abstoßung. Nur die dauerhafte Einnahme nebenwirkungsreicher immunsuppressiver Medikamente kann diese Immunantwort unterdrücken. Aus diesem Grund werden allogene Nebenschilddrüsentransplantationen in der Klinik auch nur in solchen Fällen durchgeführt, in denen der hypoparathyreoide Patient bereits transplantiert ist und daher ohnehin Immunsuppressiva erhält.

Zur Immunologie der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate liegen kaum experimentelle Daten vor. In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere das Zusammenspiel von T-Lymphozyten und Makrophagen bei der Zerstörung von Nebenschilddrüsentransplantaten untersucht. Es scheint, dass die das Transplantat infiltrierenden Makrophagen neben ihrer Fähigkeit zur An-

tigenpräsentation auch als Effektorzellen an der Transplantatzerstörung beteiligt sind und dass dies durch aktivierte T-Lymphozyten gesteuert wird.

In syngenen und allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten, d.h. Transplantate, die zum Empfänger genetisch identisch bzw. nicht-identisch sind, wurden aktivierte Makrophagen nachgewiesen, die MHC-Klasse-II-Moleküle und kostimulatorische Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren. Zwischen Tag 3 und Tag 11 nach Transplantation befanden sich aktivierte T-Lymphozyten in den allogenen Transplantaten und zwischen Tag 4 und Tag 15 waren iNOS-positive Makrophagen als mögliche Effektorzellen nachzuweisen. Im Gegensatz dazu wurden in syngenen Nebenschilddrüsentransplantaten zwar aktivierte Makrophagen, aber keine aktivierten T-Lymphozyten nachgewiesen. Die aktivierten Makrophagen waren zudem nicht iNOS-positiv.

Bei der Transplantatabstoßung handelt es sich um eine von T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort. Um dies auch am Modell der heterotopen Nebenschilddrüsentransplantation zu untersuchen – hierzu werden die Nebenschilddrüsentransplantate unter die Nierenkapsel gelegt – wurden hypokalzämische Tiere mit dem für T-Lymphozyten immunogenen Peptid P1 immunisiert. Wie erwartet, verkürzte sich die Transplantatfunktionszeit in diesen sensibilisierten Tieren von $15,8 \pm 1,8$ Tagen auf $9,4 \pm 0,9$ Tage. Das Muster der Zellinfiltration war ähnlich dem nicht-sensibilisierter Tiere. Wieder kam es kurz nach der Präsenz aktivierter T-Lymphozyten zum Auftreten iNOS-positiver Makrophagen, die bis zur vollständigen Zerstörung in den allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten blieben. Aufgrund der Daten dieser Arbeit wird vermutet, dass die aktivierten Makrophagen bestimmte Signale von den aktivierten T-Lymphozyten erhielten, worauf diese das zur Produktion des zellschädigenden Stickstoffmonoxids oder NO notwendige Enzym iNOS exprimierten.

Diese Ergebnisse deuten auf eine sehr eng abgestimmte Interaktion zwischen Makrophagen und T-Lymphozyten im Transplantat hin, die bisher so nicht beschrieben ist. Nebenschilddrüsentransplantate stellen somit ein attraktives Modell zur detaillierten Analyse der Immunologie der Transplantatabstoßung dar. Auch ist dieses Modell geeignet, insbesondere solche therapeutischen Strategien zu testen, die die Interaktion zwischen Makrophagen und T-Lymphozyten gezielt stören.

9 Anhang

Tabelle A.1: Qualitativer Nachweis von PTH Transkripten (mittels RT-PCR) explantierter WF-Nebenschilddrüsen (NSD) sowie syngener und allogener Transplantate zu definierten Zeitpunkten. (n=2, zwei Wiederholungen pro Stichprobe). In Ergänzung zu Abbildung 4.4.

	Syngen transplantierte NSD								Allogen transplantierte NSD								
	T0	T2	T4	T7	T11	T15	T20	T30	T0	T2	T4	T7	T11	T13	T15	T20	T30
GAPDH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PTH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Allogen transplantierte NSD mit vorausgehender Immunsierung mit P1								
	T0	T2	T4	T7	T9	T10	T11	T15
GAPDH	+	+	+	+	+	+	+	+
PTH	+	+	+	+	-	-	-	-

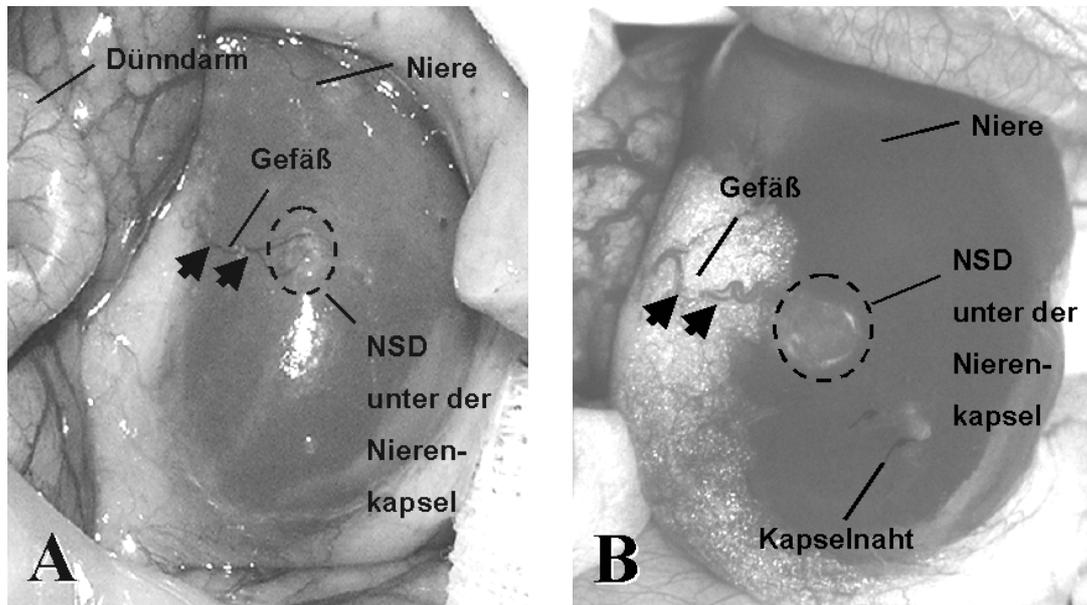


Abb. A.1: Postoperative Blutversorgung der Nebenschilddrüsentransplantate (NSD). Nachweis der makroskopischen Vaskularisierung am Tag 7 nach allogener Transplantation (A) und am Tag 106 nach syngener Transplantation. Neu gebildete Gefäße (Pfeile) ziehen zu der unter der Nierenkapsel liegenden Nebenschilddrüse. Vergrößerung x16(A), x25(B).

Tabelle A.2: Semiquantitative Auswertung der Zellinfiltration zu bestimmten Zeitpunkten nach syngener Transplantation.

	Analysezeitpunkte [Tage]								
	0	2	4	7	11	15	20	30	70
Negativ-Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MHC-II-pos. Zellen (Ox6)	+	+	++	++	+	+	+	+	+
Makrophagen (ED1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Makrophagen (ED2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dendritische Zellen (Ox62)	-	-	+	+	+	+	-	-	-
B-Zellen (Ox33)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-Zellen (R73)	-	-	-	-	+	+	+	-	-
CD8-pos. T-Zellen (341)	-	-	-	-	+	+	+	-	-
akt. T-Lymphozyten (Ox39)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NK-Zellen (10/78)	-	-	+	+	+	-	-	-	-
ICAM-1 positive Zellen (1A29)	+	+	++	++	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung: - keine positiven Zellen + ≤ 10% positive Zellen

++ 10% - 50% positive Zellen +++ > 50% positive Zellen

Tabelle A.3: Semiquantitative Auswertung der Zellinfiltration zu bestimmten Zeitpunkten nach allogener Transplantation.

	Analysezeitpunkte [Tage]															
	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13	15	16	20	30	
Negativ-Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MHC-II-pos. Zellen (Ox6)	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
Makrophagen (ED1)	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++
Makrophagen (ED2)	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Dendritische Zellen (Ox62)	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
B-Zellen (Ox33)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T-Zellen (R73)	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
CD8-pos. T-Zellen (341)	-	-	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
akt. T-Lymphozyten (Ox39)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
NK-Zellen (10/78)	-	-	+	+	+	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
ICAM-1 positive Zellen (1A29)	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+

Zeichenerklärung: - keine positiven Zellen + ≤ 10% positive Zellen

++ 10% - 50% positive Zellen +++ > 50% positive Zellen

Tabelle A.4: Semiquantitative Auswertung der Zellinfiltration zu bestimmten Zeitpunkten nach allogener Transplantation und vorhergehender P1-Immunisierung.

	Analysezeitpunkte [Tage]										
	0	2	3	4	7	9	10	11	13	15	
Negativ-Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MHC-II-pos. Zellen (Ox6)	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	
Makrophagen (ED1)	+	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	
Makrophagen (ED2)	+	+	++	++	+++	+++	++	++	/	+	
Dendritische Zellen (Ox62)	-	-	+	+	++	++	++	++	++	+	
B-Zellen (Ox33)	-	-	+	+	++	+	+	+	+	+	
T-Zellen (R73)	-	+	+	++	++	++	++	++	++	+	
CD8-pos. T-Zellen (341)	-	+	+	+	++	++	+	+	+	+	
akt. T-Lymphozyten (Ox39)	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
NK-Zellen (10/78)	-	+	+	+	++	++	++	++	+	+	
ICAM-1 positive Zellen (1A29)	+	+	++	++	+++	+++	/	++	/	+	

Zeichenerklärung: - keine positiven Zellen + ≤ 10% positive Zellen

++ 10% - 50% positive Zellen +++ > 50% positive Zellen

Tabelle A.5: Qualitativer Nachweis von iNOS Transkripten in syngen und allogenen transplantierten Nebenschilddrüsen ohne und mit vorausgehender P1-Immunsierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In Ergänzung zu Abbildungen 4.17, 4.18 und 4.24; weitere Erläuterungen siehe dort (n=2, zusätzliche zwei Wiederholungen pro Stichprobe).

	Syngen transplantierte NSD							Allogenen transplantierte NSD								
	T0	T2	T4	T7	T11	T20	T30	T0	T2	T4	T7	T11	T13	T15	T20	T30
GAPDH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
iNOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-

	Allogenen transplantierte NSD mit vorausgehender Immunsierung mit P1							
	T0	T2	T4	T7	T9	T10	T11	T15
GAPDH	+	+	+	+	+	+	+	+
iNOS	-	-	+	+	+	-	-	-

***In vitro* Kultivierung von Nebenschilddrüsen**

Einige frisch explantierte Nebenschilddrüsen wurden *in vitro* in RPMI 1640 kultiviert. Die Kultur der kompletten Organe erfolgte über zwei Wochen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Jeweils zwei Nebenschilddrüsen wurden in einer Vertiefung einer Zellkulturschale mit insgesamt vier Vertiefungen (4-well, Nunclon, Nalge Nunc Int., Dänemark) mit 500 µl Kulturmedium kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

Die immunhistologische Untersuchung zwei Wochen kultivierter Nebenschilddrüsen und frisch explantierter Nebenschilddrüsen zeigte keinen Unterschied hinsichtlich der MHC-Klasse-II-Expression und der Anzahl der Makrophagen (Tabelle A.6 u. 4.1).

Tabelle A.6: Semiquantitative Auswertung (Kap. 3.11) immunhistologischer Präparate frisch explantierter und kultivierter Nebenschilddrüsen (jeweils n=5). In Klammern ist die Bezeichnung des jeweiligen Antikörpers angegeben (Tabelle 3.4).

untersuchte Zellen	Anzahl positiver Zellen in den frisch explantierten Nebenschilddrüsen	Anzahl positiver Zellen in den kultivierten Nebenschilddrüsen
MHC-Klasse-I-positive Zellen (Ox18)	+++	+++
MHC-Klasse-II-positive Zellen (Ox6)	+	+
Makrophagen (ED1,ED2)	+	+
Adhäsionsmolekül CD54 oder ICAM-1 (1A29))	+	+
Dendritische Zellen (Ox62)	-	-
T-Lymphozyten (R73)	-	-
CD-8 T-Lymphozyten (341)	-	-
aktivierte IL-2R-positive T-Lymphozyten	-	-
NK-Zellen (10/78)	-	-
B-Lymphozyten (Ox33)	-	-

Zeichenerklärung: - keine positiven Zellen + ≤10% positive Zellen
 ++ 10% - 50% positive Zellen +++ >50% positive Zellen

Somit war es durch die *in vitro* Kultivierung nicht möglich, potentielle „passenger leukocytes“ innerhalb der Nebenschilddrüsen zu entfernen. Weiterhin wurde eine verlängerte Funktionszeit der zuvor kultivierten Transplantate nicht beobachtet. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die nach Kultivierung von explantierten Schilddrüsen (Lafferty et al., 1976) oder von Pankreas-Inselzellen (Lacy et al., 1979) eine Verlängerung der Funktionszeit der Transplantate beobachten konnten.

Die *in vitro* kultivierten Epithelkörperchen wiesen zentrale Parenchymschäden auf (Abb. A.2). Nach ihrer Transplantation stieg der Kalziumwert nur bei vier von acht transplantierten Tieren in den physiologischen Bereich. Die Abstoßung erfolgte im Mittel nach $14,3 \pm 2,3$ Tagen (Tabelle A.7).

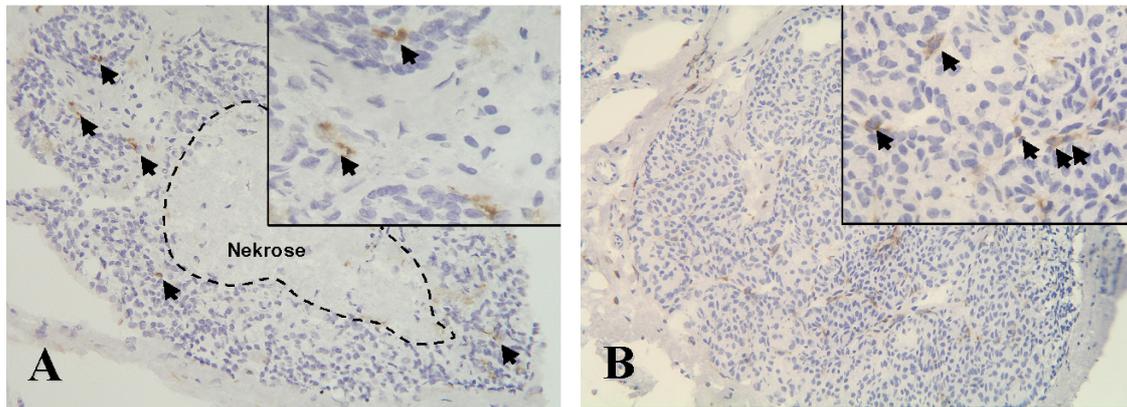


Abb. A.2: *In vitro* kultivierte Nebenschilddrüsen (A) unterscheiden sich immunhistologisch kaum von frisch explantierten Nebenschilddrüsen (B) (Tabelle 4.1 u. A.6). Hier dargestellt anhand einer repräsentativen Färbung mit Ox6 (anti-MHC-Klasse-II-Rezeptor). Jedoch wiesen viele der *in vitro* kultivierten Nebenschilddrüsen zentrale Parenchymuntergänge (gestrichelte Linie, A) auf. Vergrößerung x200.

Tabelle A.7: Transplantatfunktionszeiten von *in vitro* kultivierten Nebenschilddrüsen.

Die Bestimmung der Funktionszeit erfolgte durch Messung des Serumkalziums zu unterschiedlichen postoperativen Zeitpunkten. Die Kalziumwerte sind in mmol/l angegeben. In der Tabelle sind nur die Tiere gezeigt, deren Nebenschilddrüsen zu einem Anstieg des Serumkalziums führten. Als Abstoßungszeitpunkt ist der Tag angegeben, an dem das Serumkalzium erstmals wieder unter 2,0 mmol/l absinkt.

Tier	Tage postoperativ						Abstoßungszeitpunkt [Tag]
	0	7	11	12	14	16	
IVK-1-1	1,8	2,4	1,8	-	-	-	11
IVK-1-2	1,8	2,3	2,0	2,0	1,8	-	14
IVK-1-3	1,8	-	2,6	-	-	1,7	16
IVK-1-4	1,7	2,3	2,0	-	-	1,7	16
					Mittelwert:		14,3
					Standardabweichung:		2,3

Die Kultivierung der Nebenschilddrüsen über zwei Wochen führte somit zu keiner Verlängerung des Transplantatüberlebens im Vergleich zu unbehandelten Nebenschilddrüsen ($14,3 \pm 2,3$ versus $15,8 \pm 1,8$ Tage). Eine längere Kultivierung (4-6 Wochen) führte zu einer nahezu vollständigen Zerstörung der Nebenschilddrüsen, die auch nicht in der Lage waren, den Serumkalziumspiegel *in vivo* zu regulieren (Daten nicht gezeigt).

Schlussfolgerung: Die Kultivierung von Nebenschilddrüsen führte zu keiner Verringerung der „passenger leucocytes“. Auch wurde kein Vorteil bezüglich der Transplantatüberlebenszeit festgestellt; im Gegenteil: die *in vitro* Kultivierung führte zu einer zusätzlichen Belastung der Transplantate (Abb. A.2), was letztendlich zu einem erhöhten Transplantatversagen führte.

Transplantation allogener Nebenschilddrüsen unter kurzzeitiger Immunsuppression mit Sirolimus

Sirolimus, auch unter dem Handelsnamen Rapamycin[®] bekannt, wurde freundlicherweise von Wyeth-Ayerst Research Laboratory (Princeton, USA) zur Verfügung gestellt. Als Produkt des Pilzes *Streptomyces hygroscopicus* wurde es in den 70er Jahren von Vezina und Sehgal entdeckt. Rapamycin[®] ist ein Makrolidantibiotikum, das nicht nur antimykotische und antitumoröse Eigenschaften, sondern vor allem starke immunsuppressive Effekte besitzt (Stepkowski, 2003). Diese immunsuppressive Wirkung wurde im Hinblick auf die Abstoßung von allogenen Nebenschilddrüsentransplantaten durch orale Applikation von 1,5 mg/kg KG Rapamycin[®] an zwei Tieren über 14 Tage untersucht. Als Kontrollgruppe diente die allogene heterotope Herztransplantation von WF- auf LEW-Ratten nach einer Technik von Ono und seiner Arbeitsgruppe (Ono und Lindsey, 1969). Hierbei wurde die Funktion des Transplantates durch transabdominelle Palpation des transplantierten Herzens überprüft. Das Rapamycin[®] wurde zuvor in Fresubin (Fresenius AG) gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Die Applikation erfolgte nach Erwärmung auf Raumtemperatur mit 1 ml Insulinspritzen (B. Braun Melsungen AG). Nach der postoperativen Aufwachphase wurde den Tieren zum ersten Mal Rapamycin oral appliziert.

Die Transplantatüberlebenszeit der allogenen Nebenschilddrüsen betrug nach Immunsuppression $18,5 \pm 2,1$ Tagen (s. Tabelle A.8). Dies entsprach keiner Verlängerung gegenüber allogenen transplantierten Nebenschilddrüsen ohne Immunsuppression. Als Kontrollgruppe wurde die Abstoßung bei allogener Herztransplantation herangezogen. Ohne Behandlung wurden die orthotop transplantierten Herzen nach $5,3 \pm 1,2$ Tagen abgestossen ($n=8$). In der mit Sirolimus behandelten Gruppe wurde eine Abstoßung nach $9,3 \pm 2,1$ Tagen ($n=3$) festgestellt. Das entspricht einer Verlängerung des Transplantatüberlebens durch orale Applikation von $1,5 \text{ mg/kg KG}$ Rapamycin, obwohl die Transplantate noch während der 14-tägigen Gabe des Immunsuppressivums abgestoßen wurden. Dies lässt vermuten, dass Sirolimus in der verwendeten Dosierung einen schwachen immunsuppressiven Effekt aufweist, der bei der allogenen Herztransplantation eine Verlängerung der Transplantatfunktion zur Folge hat, jedoch nicht bei der Nebenschilddrüsentransplantation. Diese Beobachtung wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Tabelle A.8: Transplantatfunktionszeiten allogener Nebenschilddrüsen unter Immunsuppression mit Sirolimus. Die Bestimmung der Funktionszeit erfolgte durch Messung des Serumkalziums zu unterschiedlichen postoperativen Zeitpunkten. Die Kalziumwerte sind in mmol/l angegeben. Als Abstoßungszeitpunkt ist der Tag angegeben, an dem das Serumkalzium unter $2,0 \text{ mmol/l}$ absinkt.

Tier	Tage postoperativ						Abstoßungszeitpunkt [Tag]
	0	7	11	14	17	20	
S1-1	1,5	2,3	2	2	2	1,8	20
S1-2	1,4	2,3	2,1	2,1	1,8	1,8	17
Mittelwert:							18,5
Standardabweichung:							2,1

10 Literaturverzeichnis

- Alexander DZ, Pearson TC, Hendrix R, Ritchie SC, Larsen CP. Analysis of effector mechanisms in murine cardiac allograft rejection. *Transpl Immunol* 1996; 4: 46-48.
- Alfrey EJ, Perloff LJ, Asplund MW, Dafoe DC, Grossman RA, Bromberg JS, Holland T, Naji A, Barker CF. Normocalcemia thirteen years after successful parathyroid allografting in a recipient of a renal transplant. *Surgery* 1992; 111: 234-236.
- Anderson JM. Inflammatory response to implants. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1988; 34: 103-107
- Appels B, Burkart V, Kantwerk-Funke G, Funda J, Kolb-Bachofen V, Kolb H. Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *J Immunol* 1989; 142: 3803-3808.
- Arlt W, Fremerey C, Callies F, Reincke M, Schneider P, Timmermann W, Allolio B. Well-being, mood and calcium homeostasis in patients with hypoparathyroidism receiving standard treatment with calcium and vitamin D. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 215-222.
- Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992; 357: 80-82.
- Berchtold P, Seitz M. [Immunosuppression--a tightrope walk between iatrogenic harm and therapy]. *Schweiz Med Wochenschr* 1996; 126: 1603-1609.
- Bingaman AW, Pearson TC, Larsen CP. The role of CD40L in T cell-dependent nitric oxide production by murine macrophages. *Transpl Immunol* 2000; 8: 195-202.
- Bishop DK, Shelby J, Eichwald EJ. Mobilization of T lymphocytes following cardiac transplantation. Evidence that CD4-positive cells are required for cytotoxic T lymphocyte activation, inflammatory endothelial development, graft infiltration, and acute allograft rejection. *Transplantation* 1992; 53: 849-857.

- Bloom AD, Economou SG, Gebel HM. Extension of survival of rat parathyroid allografts by depletion of Ia donor cells plus preoperative cyclosporine. *Transplantation* 1987; 44: 171-174.
- Carter WB, Uy K, Ward MD, Hoying JB. Parathyroid-induced angiogenesis is VEGF-dependent. *Surgery* 2000; 128: 458-464.
- Chen H, Hayakawa D, Emura S, Tamada A, Ozawa Y, Taguchi H, Yano R, Shoumura S. Macrophages in the hamster parathyroid gland: immunohistochemical and ultrastructural investigations. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1999; 76: 221-229.
- Colton KC. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant* 1995; 4: 415-436
- Dalloul AH, Chmouzis E, Ngo K, Fung-Leung WP. Adoptively transferred CD4+ lymphocytes from CD8 -/- mice are sufficient to mediate the rejection of MHC class II or class I disparate skin grafts. *J Immunol* 1996; 156: 4114-4119.
- Duarte B, Mozes MF, John E, Aronson I, Pollak R, Jonasson O. Parathyroid allotransplantation in the treatment of complicated idiopathic primary hypoparathyroidism. *Surgery* 1985; 98: 1072-1076.
- Dunn DL. Hazardous crossing: immunosuppression and nosocomial infections in solid organ transplant recipients. *Surg Infect (Larchmt)* 2001; 2: 103-110; discussion 110-102.
- Erdheim J. Tetania Parathyreopriva. *Mitt Grenzgeb Med u Chir* 1906; 16: 632
- Garfield N, Karaplis AC. Genetics and animal models of hypoparathyroidism. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 288-294.
- Giegerich R, Meyer F, Schleiermacher C. GeneFisher--software support for the detection of postulated genes. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 1996; 4: 68-77.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 23-35.
- Haspot F, Villemain F, Laflamme G, Coulon F, Olive D, Tiollier J, Souillou JP, Vanhove B. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood* 2002; 99: 2228-2234.
- Hasse C, Bohrer T, Barth P, Stinner B, Cohen R, Cramer H, Zimmermann U, Rothmund M. Parathyroid xenotransplantation without immunosuppression in

- experimental hypoparathyroidism: long-term in vivo function following microencapsulation with a clinically suitable alginate. *World J Surg* 2000; 24: 1361-1366.
- Hasse C, Zielke A, Klock G, Barth P, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M. First successful xenotransplantation of microencapsulated human parathyroid tissue in experimental hypoparathyroidism: long-term function without immunosuppression. *J Microencapsul* 1997; 14: 617-626.
- Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B. Chirurgie 2001. Stuttgart; New York, Thieme
- Huitinga I, Ruuls SR, Jung S, Van Rooijen N, Hartung HP, Dijkstra CD. Macrophages in T cell line-mediated, demyelinating, and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 344-351.
- Hume DA, Halpin D, Charlton H, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 4174-4177.
- Itano AA, Jenkins MK. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol* 2003; 4: 733-739.
- Jones ND, Turvey SE, Van Maurik A, Hara M, Kingsley CI, Smith CH, Mellor AL, Morris PJ, Wood KJ. Differential susceptibility of heart, skin, and islet allografts to T cell-mediated rejection. *J Immunol* 2001; 166: 2824-2830.
- Jose MD, Ikezumi Y, van Rooijen N, Atkins RC, Chadban SJ. Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2003; 76: 1015-1022.
- 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.
- Lacy PE, Davie JM, Finke EH. Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24 degrees C) and a single injection of ALS. *Science* 1979; 204: 312-313.

- Lafferty KJ, Cooley MA, Woolnough J, Walker KZ. Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture. *Science* 1975; 188: 259-261.
- Lafferty KJ, Bootes A, Dart G, Talmage DW. Effect of organ culture on the survival of thyroid allografts in mice. *Transplantation* 1976; 22: 138-149.
- Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 2000; 6: 686-688.
- Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 2002; 73: 1373-1381.
- Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* 1982; 155: 31-41.
- Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990; 11: 83-88.
- Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med* 1992; 175: 1091-1101.
- Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2004 May;4(5):325-35.
- Lombardi G, Sidhu S, Daly M, Batchelor JR, Makgoba W, Lechler RI. Are primary alloresponses truly primary? *Int Immunol* 1990; 2: 9-13.
- Madri JA, Graesser D, Haas T. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol* 1996; 74: 749-757.
- Matsui Y, Inobe M, Okamoto H, Chiba S, Shimizu T, Kitabatake A, Uede T. Blockade of T cell costimulatory signals using adenovirus vectors prevents both the induction and the progression of experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 279-295.
- Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J Anat* 1944; 78: 176

- Melick RA, Gill JR, Berson SA, Yalow RS, Bertter FC, Potts JJT, Aurbach GD. Antibodies and clinical resistance to hypoparathyroidism. *N Engl J Med* 1967; 276: 144-147
- Melter M, McMahon G, Fang J, Ganz P, Briscoe DM. Current understanding of chemokine involvement in allograft transplantation. *Pediatr Transplant* 1999; 3: 10-21.
- Moskalenko V. In-vitro-Untersuchungen an mikroverkapseltem humanem Nebenschilddrüsengewebe: Vorarbeiten zur Therapie des permanenten Hypoparathyreoidismus mittels Allotransplantation ohne Immunsuppression. Inauguraldissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg, 2004.
- Nadeau KC, Azuma H, Tilney NL. Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokines RANTES and MCP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 8729-8733.
- Naji A, Silvers WK, Barker CF. Influence of organ culture on the survival of major histocompatibility complex-compatible and incompatible parathyroid allografts in rats. *Transplantation* 1981; 32: 296-298.
- Nicod LP, Joudrier S, Isler P, Spiliopoulos A, Pache J. Upregulation of CD40, CD80, CD83 or CD86 on alveolar macrophages after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1067-1075
- Olson JAJ, DeBenedetti MK, Baumann DS, et al. Parathyroid autotransplantation during thyroidectomy. Results of long-term follow-up. *Ann Surg* 1996; 223: 472-480
- Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 57: 225-229.
- Parfitt AM. Idiopathic, surgical and other varieties of parathyroid hormone deficient hypoparathyroidism. *Metabolic Basis of Endocrinology* 1979. D. L. New York, Grune&Stratton: 755-768.
- Pattou F, Kerr-Conte J, Lefebvre J, Proye C. Endocrine cell allotransplantation. *Lancet* 1998; 351: 596-597
- Penfield JG, Wang Y, Li S, Kielar MA, Sicher SC, Jeyarajah DR, Lu CY. Transplant surgery injury recruits recipient MHC class II-positive leukocytes into the kidney. *Kidney Int* 1999; 56: 1759-1769.

- Raaf JH, Farr HW, Myers WP, Good RA. Transplantation of fresh and cultured parathyroid glands in the rat. *Am J Surg* 1974; 128: 478-483.
- Reinders ME, Sho M, Izawa A, Wang P, Mukhopadhyay D, Koss KE, Geehan CS, Luster AD, Sayegh MH, Briscoe DM. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *J Clin Invest* 2003; 112: 1655-1665.
- Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev* 2003; 196: 51-64.
- Russell PS, Gittes RF. Parathyroid transplants in rats; a comparison of their survival time with that of skin grafts. *J Exp Med* 1959; 109: 571-588.
- Schwarzenbach G. The complexones and their analytical application. *Analyst*. 1955; 80: 713-729
- Schwizer RW, Leiter EH, Evans R. Macrophage-mediated cytotoxicity against cultured pancreatic islet cells. *Transplantation* 1984; 37: 539-544.
- Seegerberg EC, Grubb WG, Henderson AE. The first successful parathyroid transplant from an identical twin for the cure of permanent postoperative hypoparathyroidism. *Surgery* 1992; 111: 357-358.
- Sekine Y, Bowen LK, Heidler KM, Van Rooijen N, Brown JW, Cummings OW, Wilkes DS. Role of passenger leukocytes in allograft rejection: effect of depletion of donor alveolar macrophages on the local production of TNF-alpha, T helper 1/T helper 2 cytokines, IgG subclasses, and pathology in a rat model of lung transplantation. *J Immunol* 1997; 159: 4084-4093.
- Sitaru AG, Timmermann W, Ulrichs K, Otto C. Hierarchical immunogenicity of donor MHC class I peptides in allotransplantation. *Hum Immunol* 2002; 63: 871-879.
- Slegers TP, Torres PF, Broersma L, van Rooijen N, van Rij G, van der Gaag R. Effect of macrophage depletion on immune effector mechanisms during corneal allograft rejection in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2239-2247.
- Slegers TP, Broersma L, van Rooijen N, Hooymans JM, van Rij G, van der Gaag R. Macrophages play a role in the early phase of corneal allograft rejection in rats. *Transplantation* 2004; 77: 1641-1646.

- Stepkowski SM. Preclinical results of sirolimus treatment in transplant models. *Transplant Proc* 2003; 35: 219S-226S.
- Sterin-Borda L, Ganzinelli S, Berra A, Borda E. Novel insight into the mechanisms involved in the regulation of the m1 muscarinic receptor, iNOS and nNOS mRNA levels. *Neuropharmacology* 2003; 45: 260-269.
- Stoy N. Macrophage biology and pathobiology in the evolution of immune responses: a functional analysis. *Pathobiology* 2001; 69: 179-211.
- Tibell A, Rafael E, Wennberg L, Nordenstrom J, Bergstrom M, Geller RL, Loudovaris T, Johnson RC, Brauker JH, Neuenfeldt S, Wernerson A. Survival of macroencapsulated allogeneic parathyroid tissue one year after transplantation in nonimmunosuppressed humans. *Cell Transplant* 2001; 10: 591-599.
- Timm S, Otto C, Begrich D, Moskalenko V, Hamelmann W, Ulrichs K, Thiede A, Timmermann W. Immunogenicity of parathyroid allografts in the rat: immunosuppressive dosages effective in passenger leukocyte-rich small bowel transplants are not effective in parathyroid gland transplants with few passenger leukocytes. *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389: 46-52. Epub 2003 Dec 2005.
- Tolloczko T, Wozniewicz B, Gorski A, Sawicki A, Nawrot I, Migaj M, Zawitkowska T. Cultured parathyroid cells allotransplantation without immunosuppression for treatment of intractable hypoparathyroidism. *Ann Transplant* 1996; 1: 51-53.
- Tolloczko T, Wozniewicz B, Sawicki A, Gorski A. Allotransplantation of cultured human parathyroid cells: present status and perspectives. *Transplant Proc* 1997; 29: 998-1000.
- Tucci J, Russell A, Senior PV, Fernley R, Ferraro T, Beck F. The expression of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in developing rat parathyroid glands. *J Mol Endocrinol* 1996; 17: 149-157.
- Vahle JL, Sato M, Long GG, Young JK, Francis PC, Engelhardt JA, Westmore MS, Linda Y, Nold JB. Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 312-321.

- Waynforth HB, Flecknell PA. Experimental and surgical technique in the rat 1992., Academic Press Limited
- Winer KK, Wen Ko C, Reynolds JC. Long-term treatment of hypoparathyroidism: a randomized controlled study comparing parathyroid hormone-(1-34) versus calcitriol and calcium. *The Journal of Clinical Endocrinology* 2003; 88: 4214-4220
- Wittekind D. Traditional staining for routine diagnostic pathology including the role of tannic acid. 1. Value and limitations of the hematoxylin-eosin stain. *Biotech Histochem* 2003; 78: 261-270.
- Yamamoto N, Einaga-Naito K, Kuriyama M, Kawada Y, Yoshida R. Cellular basis of skin allograft rejection in mice: specific lysis of allogeneic skin components by non-T cells. *Transplantation* 1998; 65: 818-825.
- Yang GX, Haggmann WK. VLA-4 antagonists: potent inhibitors of lymphocyte migration. *Med Res Rev* 2003; 23: 369-392.
- Yi S, Hawthorne WJ, Lehnert AM, Ha H, Wong JK, van Rooijen N, Davey K, Patel AT, Walters SN, Chandra A, O'Connell PJ. T cell-activated macrophages are capable of both recognition and rejection of pancreatic islet xenografts. *J Immunol* 2003; 170: 2750-2758.
- Yun JJ, Fischbein MP, Laks H, Irie Y, Espejo ML, Fishbein MC, Berliner JA, Ardehali A. Rantes production during development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* 2001; 71: 1649-1656.
- Zhou P, Hwang KW, Palucki D, Kim O, Newell KA, Fu YX, Alegre ML. Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses. *Am J Transplant* 2003; 3: 259-266.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Otto, Arbeitsgruppe für Experimentelle Transplantationsimmunologie, für die exzellente wissenschaftliche Betreuung während der Promotion, die anregenden Diskussionen und für die solide wissenschaftliche Ausbildung.

Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede danke ich sehr dafür, dass die vorliegende Arbeit mit Mitteln der chirurgischen Universitätsklinik Würzburg durchgeführt werden konnte und für die Übernahme des Korreferates.

Für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung bei den mikrochirurgischen Eingriffen danke ich sehr herzlich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. S. Timm.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Experimentellen Chirurgie und Transplantations-Immunologie, für das vorzügliche Arbeitsklima in der Gruppe und ihrem Interesse am Fortschritt meiner Arbeit.

Frau M. Schneider, Biologisch-Technische Assistentin in der Abteilung Experimentelle Transplantationsimmunologie, danke ich für ihre unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der Experimente. Bei Frau C. Seubert, Medizinisch-Technische Assistentin, und Frau B. Hein, Pharmazeutisch-Technische Assistentin, bedanke ich mich für die überaus freundschaftliche Zusammenarbeit. Frau A. Prappacher danke ich für die Pflege und fürsorgliche Betreuung meiner Tiere.

Mein besonderer Dank gilt der Glaxo-Smith-Kline-Stiftung, die mir den Besuch des 20. Internationalen Transplantationskongresses in Wien ermöglichte.

Zuletzt bin ich meinen Eltern und meiner Frau Kristin unendlich dankbar. Ihre unermüdliche Unterstützung haben nicht nur diese Promotion, sondern auch das Studium der Humanmedizin erst ermöglicht.

CURRICULUM VITAE

• Persönliche Daten:

Name	Michael Ulbrich
Anschrift	Bahnhofstr. 8, 82418 Murnau
Telefon	08841-678233, 0178-9292347
e-Mail	michael-ulbrich@arcor.de
Geburtsdatum, -ort	08.03.1979, Würzburg
Familienstand	verheiratet mit Kristin Ulbrich, geb. Naumann

• Ausbildung:

10/1999-06/2006	Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/1998-06/1999	Grundwehrdienst als Fallschirmjäger/-packer
09/1985-06/1998	Grundschule und Gymnasium Haßfurt Abschluß: Abitur (Bayern)

• Berufliche Praxis:

seit 07/2006	Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin, Murnau, Klinikum Garmisch-Partenkirchen GmbH
04/2005-03/2006	Praktisches Jahr in Chirurgie (Münsterlingen, Schweiz), Innerer Medizin (Rochester, New York, USA) und Orthopädie (Würzburg)
03/2002-03/2004	Famulaturen in Innerer Medizin, Plastischer Chirurgie, Ästhetischer Chirurgie, Herzchirurgie, Kardiologie und Anästhesie
09/2001-05/2002	Hilfswissenschaftler am Lehrstuhl für Informatik II an der Universität Würzburg (Prof. Dr. Albert)
02/2000-12/2003	regelmäßige Sitzwachentätigkeit (krankenpflegerische Tätigkeiten)

• Kenntnisse und Tätigkeiten:

Sprachen	Englisch, Französisch
EDV	Programmierung (Java, HTML), MS-Office, Grafikverarbeitung (Adobe Photoshop)
weitere Kenntnisse	Grundkurs Tierschutz und Versuchstierkunde (40h)

Wissenschaftliche Publikation

Ulbrich M., Timm S., Ulrichs K., Thiede A., Timmermann W., Otto C. The Role of alloantigen-induced activation of T cells and macrophages in parathyroid allograft rejection. *Transplantation* 2004 78 (2): 515-516 (P895).

Vorträge im Rahmen des Seminars der Experimentellen Transplantations-Immunologie

Dezember 2002 Vortrag über die „Transplantation von Nebenschilddrüsen unter Immunsuppression“.

April 2003 Vortrag über die „Abstossung von transplantierten Nebenschilddrüsen: Mögliche Bedeutung von passenger leukocytes“.

Nationale und internationale Kongresse

September 2004 **20. Kongress der Internationalen Gesellschaft für Transplantation in Wien**
Posterpräsentation mit dem Titel: „The role of alloantigen-induced activation of T cells and macrophages in parathyroid allograft rejection“.

Oktober 2004 **Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft in Kiel**
Posterpräsentation mit dem Titel: „Die Rolle von Makrophagen und T-Lymphozyten bei der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate“.

April 2005 **Jährlicher Promomed-Kongress der medizinischen Fakultät Würzburg**
2. Platz in der Kategorie Poster mit dem Titel: „Die Rolle von Makrophagen und T-Lymphozyten bei der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate“.

September 2005 **Jahrestagung der Vereinigung der Mittelrheinischen Chirurgen in Würzburg**
Posterpräsentation mit dem Titel: „Die Makrophagenvermittelte Zytotoxizität und Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten führen zur Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate“.

Würzburg, den 27.10.2006

