

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede
Abteilung für Molekulare Onkoimmunologie
Leiterin: Frau Professor Dr. rer. nat. A. M. Waaga-Gasser

**Untersuchung regulatorischer T-Zellen bei
Toleranzinduktion nach experimenteller Nierentransplantation
unter Berücksichtigung co-stimulatorischer Signalwege**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Martin Grimm
aus Nürnberg

Würzburg, April 2006

Referent: Professor Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

Koreferent: Professor Dr. med. C. Wanner

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2007

Der Promovend ist Zahnarzt:

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Fragestellung	10
3. Material und Methoden	11
3.1. Herstellung der allospezifischen-MHC-Klasse-II-Peptide	11
3.2. Herstellung von RT.D ^u β(20-44) spezifischen T-Zell-Linien und -Klone	12
3.3. Tiermodell	14
3.3.1 Tierhaltung	14
3.3.2. Delayed Type Hypersensitivity (DTH)-Reaktion	15
3.3.3. Techniken der Nieren- und Hauttransplantation	15
3.3.4. Messung der Nierenfunktion	16
3.3.5. Versuchsgruppen für die Herstellung der T-Zell-Linien und -Klone	16
3.3.6. Versuchsgruppen für die funktionelle Analyse der T-Zell-Klone in vivo	16
3.3.7. Messung der spezifischen Toleranz	18
3.4. PCR Analyse der T-Zellrezeptor Vβ Expression	19
3.5. ELISPOT-Testverfahren	19
3.6. Proliferationstest	20
3.7. Zytokin-Genexpressionsanalyse in Nieren-Allotransplantaten - RNase Protectionassay	21
3.8. Real Time PCR Analyse	22
3.9. Histologische und immunhistologische Analyse	23
3.9.1. Histologische Untersuchungen (Morphologie)	23
3.9.2. Immunhistologischer Nachweis von mononukleären Zellinfiltraten, der Expression von IFN-γ und IL-10 und des Transkriptionsfaktors GATA-3 und des Th2-Markers T1/ST2	23
3.9.3. Immunhistologische Analyse der co-stimulatorischen Signale	24

	Seite
3.10. Statistische Analyse	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Charakterisierung der RT.D ^U β(20-44) spezifischen T-Zell-Linien und T-Zell-Klone aus abstoßenden und toleranten Tieren	29
4.1.1. Analyse der T-Zell-Linien	29
4.1.2. Analyse der T-Zell-Klone	30
4.1.3. Phänotypische Charakterisierung der T-Zell-Linien und –Klone	31
4.1.4. Charakterisierung des T-Zellrezeptor-Vβ-Repertoires der T-Zell-Klone	33
4.2. Funktionelle Untersuchung der Th2-Zell-Klone in vitro	33
4.3. Überprüfung der regulatorischen Funktion der Th2-Zell-Klone in vivo	34
4.4. Charakterisierung der Th1- und Th2- induzierten Effekte nach Transplantation	36
4.4.1. Überlebensdaten nach Nierentransplantation	36
4.4.2. Überlebensdaten nach Hauttransplantation (Toleranz)	37
4.4.3. Ergebnisse der Nierenfunktion nach Nierentransplantation	38
4.4.4. Ergebnisse des Zytokinprofils (ELISPOT)	39
4.4.5. Zytokin-Genexpressionsergebnisse (RNAse Protectionassay und Real time PCR)	40
4.4.6. Histologische und immunhistologische Analyse	42
4.4.6.1. Histologische Untersuchungen (Morphologie)	42
4.4.6.2. Zytokinprofil bei Tieren mit chronischer Transplantatabstoßung und bei toleranten Empfängern	43
4.4.7. Ergebnisse und Histologie der Doppelmarkierung	45
4.4.8. Zusammenfassung der Ergebnisse	48
5. Beantwortung der Fragen	52
6. Diskussion	58
7. Zusammenfassung	65
8. Literaturverzeichnis	67
9. Anhang (Abkürzungen)	74

1. Einleitung

Organtransplantationen bedeuten im Falle einer Nierentransplantation eine Befreiung von einer chronischen Dialysepflichtigkeit und sind in der Regel mit einer deutlich verbesserten Lebensqualität für die Patienten verbunden. Für die Mehrzahl der Patienten besteht damit nach Transplantation die Möglichkeit, nach Rehabilitation in das Arbeitsleben zurückzukehren. Aus einzelnen Untersuchungen zeigt sich heute für Patienten nach Nierentransplantation eine verbesserte Langzeitprognose gegenüber den Patienten, die weiterhin der Dialysepflicht unterliegen (1).

Trotz der Verbesserungen zeigt sich für die Nierentransplantation die chronische Transplantatabstoßung mittlerweile als eine der häufigsten Ursachen terminalen Nierenversagens, so dass langfristig zwischen 25 bis 30% der betroffenen Patienten nach Rückkehr zur Dialyse auf ein erneutes Transplantat warten. In der Bundesrepublik Deutschland wären folglich heute mehr als 20% der zur Verfügung stehenden Nieren an Patienten nach vorausgegangenem Erst- oder Mehrfach-Transplantationen zu übertragen. Betrachtet man ausschließlich das 1-Jahres-Transplantatüberleben, so ist dieses seit Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) in den frühen 80er Jahren um 10 bis 20% weiter verbessert worden (2). CsA hemmt die Produktion von IL-2 und anderen proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-3, IL-4, Interferon (IFN)- γ und Tumornekrosefaktor (TNF)- α und führt damit zu einer verminderten T-Zellproliferation (3-5). Damit wird die Akzeptanz eines Transplantates deutlich verbessert und die akute Abstoßung innerhalb der ersten drei Monate verhindert (6).

Eine entscheidende Ursache für ein limitiertes Langzeit-Transplantatüberleben stellt heute die chronische Abstoßungsreaktion dar. Dieses ist ein zum Teil unverstandener immunologischer Prozess. Als auslösende Risikofaktoren chronischer Abstoßung werden eine HLA (Human Leukocyte Antigen, Haupthistokompatibilitätskomplex beim Menschen) Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger, akute Abstoßungsreaktionen und eine inadäquate Immunsuppression durch initiale Ischämie und Reperfusionsschäden sowie begleitende Infektionen angesehen. Problematisch stellt sich ferner die nach Organtransplantation im Empfänger relativ unspezifisch durchgeführte Immunsuppression im klinischen Alltag dar. Zum Teil sind die Immunsuppressiva mit erheblichen Neben-

wirkungen auf einzelne Organsysteme oder Stoffwechselprozesse sowie der Gefahr der Auslösung opportunistischer Infektionen und der Induktion lymphoproliferativer Erkrankungen verbunden. Medikamenten-Interaktionen sind zusätzlich zu lösende Probleme in der täglichen Routine transplantierten Patienten (3, 7, 8).

Vor dem Hintergrund aktuell vorliegender Langzeitergebnisse nach Transplantation zeigt sich die Notwendigkeit einer weiteren Aufklärung zugrundeliegender zellulärer und molekularer Immunmechanismen, ausgelöst durch immunogene (HLA-Inkompatibilität, akute Abstoßung) und nicht-immunogene (Ischämie/ Reperfusionsschaden nach Transplantation oder begleitende virale Infektion) Faktoren, die zu einer chronischen Transplantatabstoßung führen. Gegenwärtiges Ziel in der Transplantationsmedizin bleibt es, durch moderne immuntherapeutische Strategien eine auf das Transplantat spezifisch ausgerichtete Unterdrückung der Immunantwort und damit ein verbessertes Langzeitüberleben mit dem Endziel einer Langzeittoleranz für das übertragene Organe zu erreichen.

An der chronischen Transplantatabstoßung können nach derzeitigen Erkenntnissen aus experimentellen Modellen alle zellulären und humoralen Elemente des Immunsystems beteiligt sein. Dieses beinhaltet eine durch Makrophagen und CD4+ T-Zellen vermittelte Immunantwort vom verzögerten Typ (delayed-type hypersensitivity response, DTH, Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ) und weiterhin die Produktion von Antikörpern gegen Spenderantigene und inflammatorische Zytokine.

Für die Bedeutung immunogener oder auch alloantigenabhängiger Faktoren bei der Induktion chronischer Abstoßung nach klinischer Transplantation spricht, dass die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer solchen schrittweisen Abstoßung mit dem HLA Mismatch (9), akuten Abstoßungen (10), und der Tatsache einer unterdosierten Immunsuppression in dem ersten Jahr nach Transplantation (11) in Zusammenhang gebracht wird. Bekannt ist heute die Beteiligung zellulärer Reaktionen bei der chronischen Transplantatabstoßung (12).

Die spezifische Antigenerkennung als zentrales Ereignis der zellulären Immunantwort bei der Transplantatabstoßung beruht grundsätzlich auf dem Kontakt zwischen antigenpräsentierenden Zellen (APC = dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen) und T-Lymphozyten. Dabei wird das Antigen als Komplex aus Peptid und MHC (major histocompatibility complex, Haupthistokompa-

tibilitätskomplex) Molekül erkannt, wobei exogenes Antigen typischerweise zusammen mit MHC Klasse II Molekülen auf APC's von CD4+ T- Zellen erkannt wird. Die Erkennung von endogenem Antigen findet dagegen zusammen mit MHC Klasse I Molekülen auf APC's durch CD8+ T-Zellen statt. Im weiteren Verlauf werden von Makrophagen und T-Zellen Zytokine und Chemokine gebildet. Diese können Komponenten der angeborenen Immunität aktivieren und spezifische Mechanismen der Antikörperbildung durch B-Zellen aktivieren. Die durch CD8+ T-Zellen vermittelte Zytotoxizität ist ebenfalls von großer Bedeutung bei der entstehenden Immunantwort.

MHC Klasse II Moleküle sind im Gegensatz zu Klasse I Molekülen (MHC Klasse I Moleküle enthalten zwei separate Polypeptidketten, eine vom MHC Komplex codierte α -Kette und eine nicht MHC-codierte β -Kette, $\beta 2$ Mikroglobulin) aus nicht-covalent-gebundenen Polypeptid-Ketten zusammengesetzte α/β Heterodimere. Diese α -und β -Ketten sind in ihrer Gesamtstruktur denen der Klasse I Moleküle gegenüber vergleichbar, wobei die α -Kette etwas länger aufgebaut ist. Jede Kette enthält eine relativ konstante β -Faltblatt-Region sowie eine hochpolymorphe alpha Helix-Region. Als charakteristisches Merkmal der MHC Moleküle ist die Peptid-Bindungsgrube anzusehen, der Ort an dem antigene Strukturen präsentiert werden. Die Antigen-Bindungsregion der MHC Klasse II Moleküle formiert sich aus einer Interaktion beider Ketten, der $\alpha 1$ und $\beta 1$ Segmente. Beide Abschnitte entfalten sich zu einer achtsträngigen Faltblattstruktur zusammen, die zwei α -Helices unterstützt. Vier Stränge aus der β Faltblattstruktur und einer aus der α -Helix werden dabei aus der $\alpha 1$ Kette gebildet, während die anderen vier Stränge sowie die zweite α -Helix aus der $\beta 1$ Kette formiert werden. Der genetische Polymorphismus der MHC Klasse II Moleküle determiniert dabei die molekulare und chemische Oberflächenbeschaffenheit des Antigen-Bindungsabschnittes und bestimmt dabei die Spezifität und Affinität der Peptidbindung bei der T-Zell-Erkennung (13). MHC Klasse II Moleküle exprimieren üblicherweise im Unterschied zu Klasse I Molekülen Peptide, die aus extrazellulären Proteinen stammen und von CD4+ T Zellen erkannt werden (14) (Abb. 1.1a).

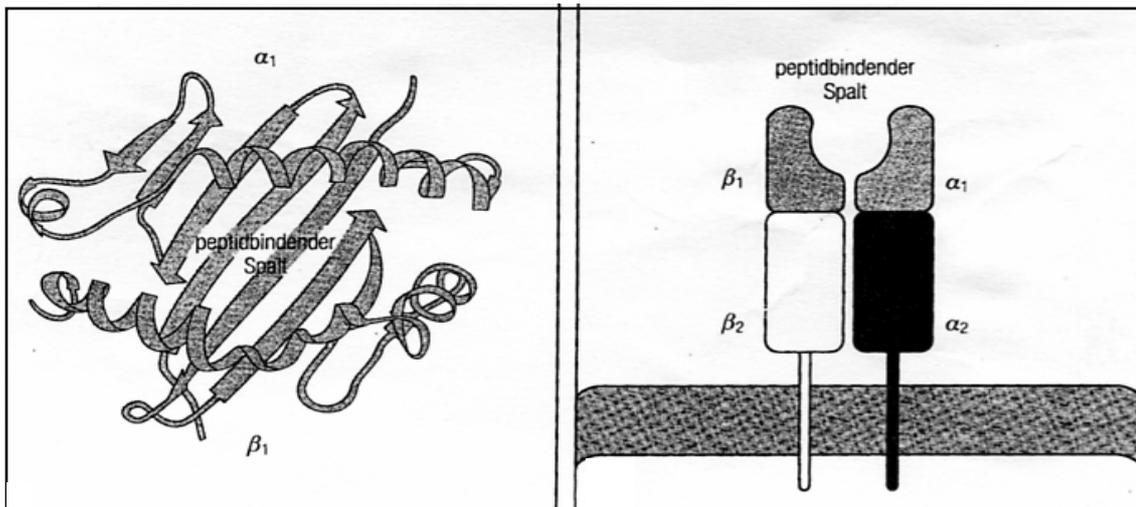


Abb.1.1a: MHC-Klasse-II-Moleküle sind aus non-covalent-gebundenen Polpeptid-Ketten zusammengesetzte α/β Heterodimere. Die Antigen-Bindungsregion der MHC Klasse II Moleküle formiert sich aus einer Interaktionen beider Ketten, der $\alpha 1$ und $\beta 1$ Segmente (14, 15).

Die Alloantigenerkennung durch spezifische T-Lymphozyten stellt das primäre und zugleich zentrale Ereignis bei der zellulären Immunantwort nach Transplantation dar. Dieses führt durch zytotoxische Effektormechanismen zum Organverlust.

Für die Alloerkennung sind zwei sich notwendigerweise gegenseitig nicht ausschließende Mechanismen verantwortlich, die direkte und die indirekte Alloantigenerkennung (Abb. 1.1b) (16-18). Beim direkten Weg erkennen die T-Zellen intakte Allo-MHC Moleküle auf der Oberfläche von spendereigenen Antigen präsentierenden Zellen, die bei Transplantation eines Organs mit übertragen werden (Abb. 1.1b). Bestimmte Peptide, die endogenen Proteinen entstammen und in der Peptid-Bindungsgrube des Spender MHC mitverankert sind, können bei diesem Weg der Alloerkennung ebenso eine Rolle spielen (19).

Beim indirekten Weg erkennen T-Zellen prozessiertes Alloantigen in Form von Peptidstrukturen, die auf der Oberfläche empfängereigener APC's präsentiert werden. Lösliche, aus dem Transplantat freigesetzte MHC Moleküle, werden (graue Strukturen, Abb. 1.1b) als Antigen von empfängereigenen APC's aufgenommen und nach Aufspaltung in ihre wesentlichen Peptidbestandteile (graue Kreise) den T-Zellen präsentiert werden. Dieser Mechanismus entspricht dem normalen Weg der Antigenerkennung, bei dem der Wirtsorganismus exogenes Peptid, das durch Selbst-APC's präsentiert wird, als Fremdstruktur erkennt.

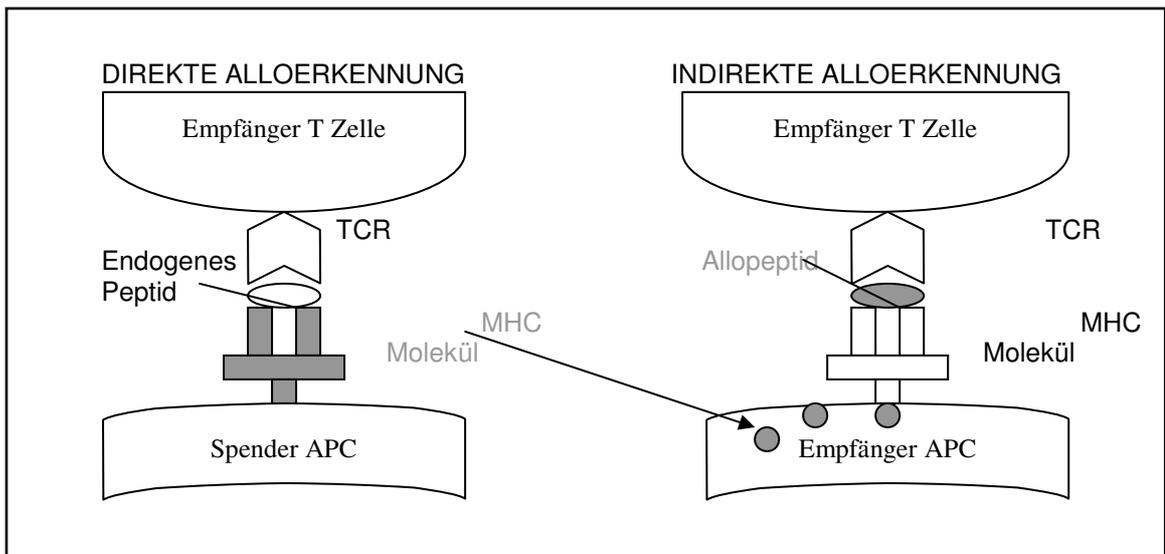


Abb.1.1b: Mechanismen der Alloantigenerkennung: Beim direkten Weg erkennen die T-Zellen intakte Allo-MHC Moleküle auf der Oberfläche von spendereigenen Antigen präsentierenden Zellen, die bei Transplantation eines Organs mit übertragen werden. Beim indirekten Weg erkennen T-Zellen prozessiertes Alloantigen in Form von Peptidstrukturen, die auf der Oberfläche empfangereigener APC's präsentiert werden. Lösliche MHC Moleküle, die aus dem Transplantat freigesetzt wurden (graue Strukturen), werden als Antigen von empfangereigenen APC's aufgenommen und nach Aufspaltung in ihre wesentlichen Peptidbestandteile (graue Kreise) den T-Zellen präsentiert.

T-Zellen benötigen zur vollständigen Aktivierung nach Antigenerkennung zwei verschiedene Signale (20). Signal 1 wird aus dem Komplex des T-Zellrezeptors und dem dazugehörigen Peptid zusammen mit MHC auf APC's gebildet (Abb. 1.1c). Signal 2 setzt sich aus einem oder mehreren co-stimulatorischen Oberflächenrezeptoren auf der T Zelle und dazugehörigem Liganden auf APC's zusammen. Das zweite co-stimulatorische Signal ist erforderlich, um eine apoptotische Antwort (programmierter Zelltod) oder einen Zustand einer Anergie (Zustand fehlender Reaktion auf Antigene) durch den Lymphozyten zu vermeiden. Die Interaktion von CD28 auf dem T-Lymphozyten mit B-7 Proteinen auf einer APC liefert dieses notwendige co-stimulatorische Signal (21, 22). Das bislang am besten charakterisierte co-stimulatorische Signal ist das zwischen dem CD28 Molekül zusammen mit dem dazugehörigen Liganden auf APC's, den Molekülen B7-1 und B7-2. Die Signalübertragung durch CD28/B7-1 oder B7-2 bewahrt Lymphozyten vor dem Zelltod oder der Apoptose (23). CTLA-4 als zusätzlicher Ligand in diesem komplexen co-stimulatorischen System weist inhibitorische Signalwirkung auf. Während CD28 auf ruhenden T-Zellen vorzufinden ist, wird CTLA-4 erst nach entsprechender Aktivierung auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert und scheint die Immunantwort durch hochaffine Bindung mit den dazugehörigen B7 Liganden zu blockieren (24). Knockout-Mäuse, bei de-

nen das CTLA-4 Molekül ausgeschaltet war, zeigten in diesem Zusammenhang eine Reihe lymphoproliferativer Erkrankungen mit frühem letalem Ausgang (25). Die Gabe blockierender anti-CTLA-4 monoklonaler Antikörper ergab entsprechend eine Verschlechterung der Autoimmunerkrankungen und verhinderte die Induktion der T-Zell Anergie, wodurch die Expansion bestimmter antigenspezifischer T-Zell-Klone in vivo verhindert wird (26). Dieses deutet auf die kritische Bedeutung des CTLA-4-Signals zur Unterbrechung einer T-Zell gebundenen Immunantwort hin.

Die Bindung von CD28 an das B7-1 oder B7-2 Molekül und damit die co-stimulatorische zweite Signalwirkung kann durch CTLA-4 Ig, einem rekombinanten Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des CTLA-4 Moleküls, mit der schweren Kette eines Immunglobulins IgG 1 blockiert werden (27). CTLA-4 Ig bindet mit höherer Affinität als CD28 sowohl an das B7-1 als auch das B7-2 Molekül und wirkt damit als kompetitiver Inhibitor der CD28 Bindung. Dies führt zu einer T-Zell-Anergie in vitro (28). In verschiedenen experimentellen Ansätzen in vivo hat sich die co-stimulatorische Blockade durch systemische Gabe von CTLA-4 Ig als sehr effektiv in der Unterdrückung der Transplantatabstoßung gezeigt. In vielen Modellen führte dieses zu deutlich verlängerten Überlebenszeiten und zur Induktion langfristiger Organtoleranz (29-31). Der genaue Mechanismus, über den nach CD28-B7 co-stimulatorischer T-Zell-Blockade mit CTLA-4 Ig in vivo Toleranz ausgelöst wird, bleibt bislang ungeklärt. Diskutiert wird gegenwärtig die Induktion einer T-Zell-Anergie. Untersuchungen nach allogener Nierentransplantation zeigten, dass die Induktion systemischer Toleranz im Empfänger nach nur einmaliger Gabe von CTLA-4 Ig nach Transplantation mit einer selektiven Unterdrückung der Th1 spezifischen Zytokine wie IL-2 und INF- γ , nicht aber Th2 typischer Zytokine wie IL-4 und IL-10 im Zielorgan verbunden war (32). Chronische Abstoßung nach Herz- und Nierentransplantation in der Ratte wurde entweder verhindert oder aber, bei verzögerter Gabe von CTLA-4 Ig nach Transplantation, in ihrem Fortschreiten unterbrochen (33-36). Bei kombinierter Gabe von CTLA-4 Ig mit Cyclosporin A zusammen wurde jedoch der positive Effekt dieser Substanz wieder aufgehoben (34). Dieses erscheint besonderes vor dem Hintergrund der Anwendung von CTLA-4 Ig am Menschen von großer Bedeutung zu sein, da die Substanz zur Zeit bereits in klinischen Studien eingesetzt wird.

Zusammenfassend deuten bisher vorliegende Ergebnisse darauf hin, dass die T- Zellaktivierung als zentrales Ereignis am Anfang komplexer immunologischer Vorgänge steht und damit von essenzieller Bedeutung für das Schicksal eines übertragenen Organs hinsichtlich der Ausbildung oder aber der Vermeidung einer chronischen Abstoßung ist.

Dem indirekten Weg der Antigenerkennung durch bereits sensibilisierte T-Zellen wird gegenwärtig eine dominierende Rolle bei der chronischen Abstoßung beigemessen, da, nach einer entsprechenden Phase der Antigenaufnahme und -präsentation über empfängereigene APC's, CD4+ T-Zellen den Prozess der Organabstoßung durch entsprechende Aktivierung alloreaktiver CD8+ Zellen und B-Zellen in Gang halten oder auch verstärken können. Hierbei spielt die Dichotomie der CD4+ T-Helferzellen in zwei unterschiedliche Populationen, von denen jede ihr eigenes Profil an Zytokinen produziert und damit ihrer eigenen Effektorfunktionen vermittelt (37), eine wichtige Rolle. T-Helferzellen Typ1 (Th1-Zellen) produzieren IL-2 und IFN- γ und führen zur Aktivierung von Makrophagen und induzieren eine Immunantwort des verzögerten Typs, die DTH Antwort. T-Helferzellen Typ2 produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die der Regulation der B-Zell-Funktionen dienen (Abb.1.1c).

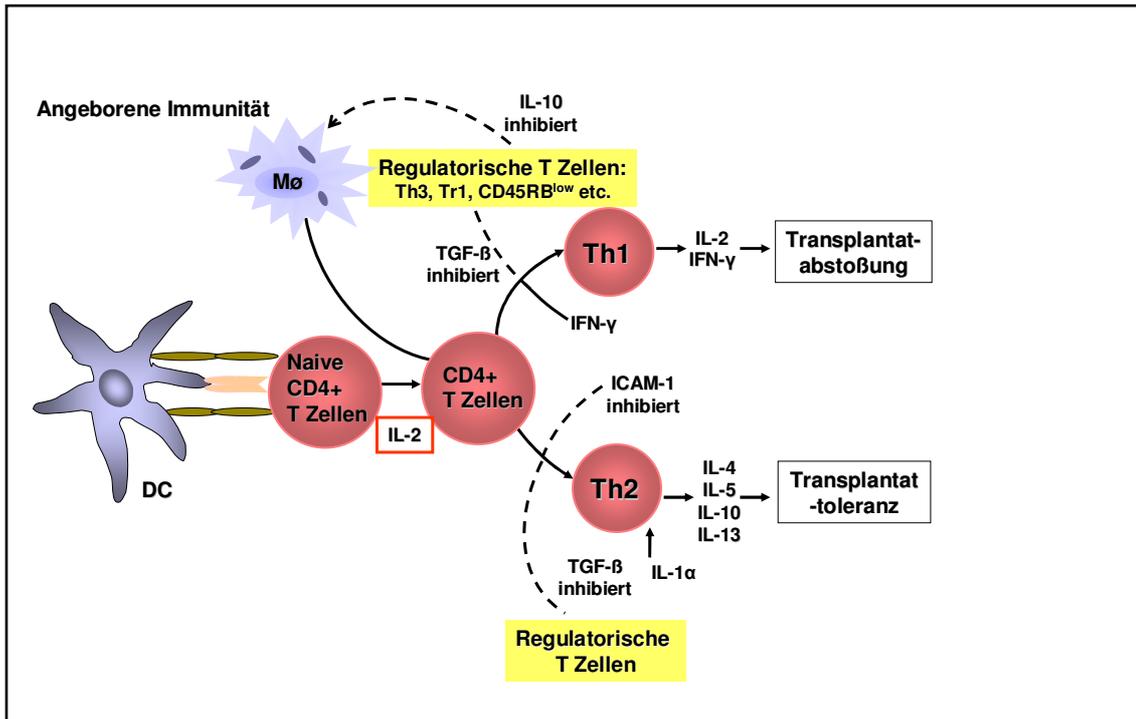


Abb.1.1c: Regulation sezernierter Zytokine von T-Helferzellen: Nach Präsentation eines Peptids (des Spenders) durch eine Dendritische Zelle (DC), entwickelt sich eine naive CD4 T-Zelle (des Empfängers) zu einer Th1-Zelle, deren Zytokinprofil zu inflammatorischen (Transplantatabstoßung) Prozessen (IL-2 (Interleukin), IFN-γ (Interferon)), und Entwicklung von naiven T-Zellen in CD4-Zellen führt. Diese Zytokine bewirken eine Transplantatabstoßung. Dagegen führen Th2-Zellen, deren Zytokinspektrum IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 umfasst zu einer Transplantattoleranz. Regulatorische T-Zellen (Th3, Tr1, CD45RB^{low}) inhibieren durch ihre Zytokine TGF-β und IL-10 die Makrophagenaktivierung, sowie die Th1-Zell-Antwort und damit inflammatorische Prozesse (IL-1α). TGF-β hemmt sowohl die Entwicklung von CD4 T-Zellen in Th1-Zellen als auch jene in Th2-Zellen. ICAM-1 dagegen inhibiert nur die Entwicklung zu Th2-Zellen.

Lymphozyten, die gleichzeitig CD4 und CD25 exprimieren, sind essentiell für die Selbst-Toleranz. Ihnen werden regulatorische Eigenschaften zugeschrieben. T regulatorische Zellen verhinderten in experimentellen Modellen Auto-Immunerkrankungen und induzierten Langzeittoleranz nach allogener Organtransplantation durch Hemmung von auto- bzw. alloreaktiven Lymphozyten.

Die akute Transplantatabstoßung ist eine überwiegend Th1-vermittelte Immunantwort. Das Ausmaß der Th1- und der Th2-Zytokinaktivität im Rahmen der chronischen Abstoßung kann noch nicht exakt bestimmt werden. Da vermutet wird, dass sowohl die DTH Antwort als auch Alloantikörper eine wichtige Rolle bei der chronischen Abstoßung spielen, müssen sowohl Th1- als auch Th2-Zellen bei diesem Prozess beteiligt sein. Bis heute ist unbekannt, ob die T-Zellaktivierung durch den indirekten Weg vorzugsweise Th1- oder Th2-Zellen aktiviert.

Einige Autoimmun- und Transplantationsmodelle zeigten, dass die Toleranzinduktion manchmal mit einer sogenannten 'Immune Deviation', d. h. einer Art

Umleitung der Immunantwort über andere Effektorarme mit Betonung der Th2-Zellfunktionen und gleichzeitiger Inhibition der Th1-Aktivierung im Zielorgan verbunden war (38). Im Hinblick auf die Transplantation ist unbekannt, ob dies letztendlich für die Transplantatfunktion schädlich oder nützlich ist.

Die mit der Zielsetzung dieser Arbeit verbundenen Experimente sollten die Bedeutung der molekularen und zellulären Mechanismen der Alloantigenerkennung nach experimenteller Nierentransplantation klären. Hierbei wurde der Charakterisierung bestimmter dominierender Peptidsequenzen und T-Zellrezeptor-Bindungsmuster (TCRV β -Profil) bei gegebener MHC Klasse II Inkompatibilität ein besonderer Stellenwert beigemessen. Dazu wurden zunächst im Tiermodell mit entweder stabiler Transplantatfunktion oder bei Tieren mit akuter und chronischer Abstoßung alloreaktive T-Zell-Klone etabliert, daraufhin *in vitro* näher charakterisiert und *in vitro* und *in vivo* funktionell analysiert. Außerdem wurden die co-stimulatorischen Signale bei Langzeittoleranz und bei beschleunigter, chronischer Transplantatabstoßung untersucht.

2. Fragestellung

Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften weisen die aus chronisch abstoßenden und die, mit langfristiger Organakzeptanz hergestellten Th1 und Th2-Zell-Klone in vitro auf?
2. Welche regulatorischen Eigenschaften haben die aus unbeeinflussten, langfristig überlebenden Empfängern hergestellten Th2-Zell-Klone in vivo?
3. Welches charakteristische Zytokinprofil wird bei einer Langzeittoleranz und welches bei einer beschleunigten chronischen Transplantatabstoßung beobachtet?
4. Welche morphologischen Charakteristika kennzeichnen die regulatorischen Zellen in vivo?
5. Welche co-stimulatorischen Signale werden mit einer Langzeittoleranz und welche mit einer beschleunigten, chronischen Transplantatabstoßung in Verbindung gebracht?

3. Material und Methoden

3.1. Herstellung der allospezifischen-MHC-Klasse-II-Peptide

Die polymorphen RT1.B und RT1.D β Regionen von RT1^u (WF) wurden untersucht und eine Reihe von Peptiden entsprechend der ganzen β -Kette hypervariablen Regionen von RT1 synthetisiert (Quality Control Biochemicals Proimmune, Littlemore, England). Zwei Peptide, die den Sequenzen 20-44 entsprachen, wurden kommerziell wie beschrieben (39) synthetisiert (Abb. 3.1).

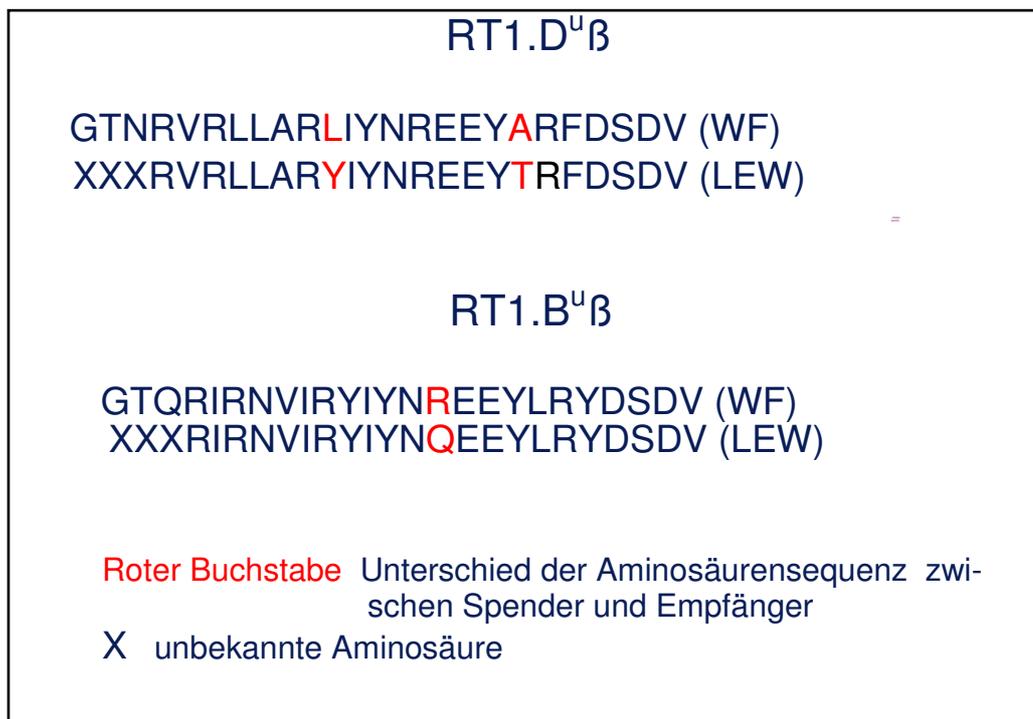


Abb.3.1: Darstellung der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen beider alloreaktiver Peptide (RT1.D^u β , RT1.B^u β). RT1.D^u β Peptid löst eine immunogene Wirkung in vivo (DTH-Antwort) und in vitro (Proliferation) aus.

Das RT1.D^u β Peptid wurde in vitro und in vivo als immunogen beschrieben; nach der Immunisierung der LEW-Tiere induziert es eine T-Zell proliferative Antwort in vitro und eine DTH-Antwort in vivo (39). Außerdem induziert das RT1.D^u β Peptid Peptid eine proliferative Antwort in T-Zellen von Tieren, die WF-vaskularisierte Allotransplantate abstoßen (40, 41). Es wurde gezeigt, dass das Sensibilisieren der LEW-Empfänger mit dem RT1.D^u β 20-44 Peptid vor der Transplantation den Abstoßungsprozess der vaskularisierten WF-Herzallotransplantate beschleunigt (42).

3.2. Die Herstellung von RT1.D^Uβ(20-44) spezifischen T-Zell-Linien und -Klone

Die Lymphozyten wurden von der transplantierten Niere der abstoßenden (Tag 7) oder toleranten (> 100 Tage) LEW-Empfänger und der völlig allogenen WF-Nierenallotransplantate isoliert. Das Organ wurde in kleine Bruchstücke geschnitten, und anschließend wurden diese mit einem Stempel durch ein Stahlsieb desintegriert (Dako, Hamburg). Die so gewonnenen Zellen wurden nachfolgend bei 311g zentrifugiert und zweimalig gewaschen. Für das Waschen der Zellen wurde Kompletmedium verwendet, bestehend aus RPMI 1640 und 4%igem foetalem Kälberserum (FCS; Gibco, Uxbridge, England), 100 U/ml Penicillin (Biochrom, Berlin), 100 mg/ml Streptomycin (Biochrom), 2×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol (Gibco, Uxbridge, England), 5 mM HEPES (Biochrom), 1% nonessential amino acid (Biochrom) und 1 mM Natriumpyruvat (Biochrom). Die Zellen wurden nachfolgend in insgesamt 10 ml 4%igem RPMI-Kompletmedium resuspendiert und nach Hinzugabe von 0,4 mg Deoxyribonuclease I (Sigma Chemical Co., Taufkirchen) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und mit Ficoll (Amerschan Biosciences, Uppsala, Schweden) bei 311g für 20 min zentrifugiert. Daran fügte sich ein dreimaliges Waschen der Zellen mit Resuspendierung in 4%igem Kompletmedium mit Auszählung der Zellen an. Die Milz eines jeden Tieres wurde durch ein steriles 60 Gauge Stahlsieb desintegriert, zweimalig gewaschen und in Kompletmedium resuspendiert. Die gewonnenen Zellen wurden ebenso ausgezählt. Die gewonnenen Lymphozyten aus den Nieren wurden gleich mit 50 µg/ml RT1.D^Uβ20-44 Peptid stimuliert und für 3-4 Tage im Kulturmedium (425 ml RPMI-Medium 1640), 50 ml fetal Kälberserum, 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 000 U/10 000 µg/ml), 5 ml HEPES, 5 ml (Non-Acid 100 Fach), 5 ml Natrium Pyruvat (100 mM), 204 µl 2-Mercaptoethanol (50 mM, Gibco), 5 ml L-Glutamin (200 mM, Biochrom) plus 10% T-Stim Kultur supplement human, ohne PHA (phytohaemagglutinin; BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg), kultiviert. Die Zugabe der APC's war bei der ersten Stimulation mit dem Peptid entbehrlich, denn die APC's waren unter den Nierenzellen enthalten. Die Zugabe des Peptides erfolgte im Verhältnis 50µg/2x10⁵ Zellen. 3-4 Tage später wurden die Zellen mit 311g abzentrifugiert, zweimal mit Waschmedium (im Kulturmedium wurde das FCS (10%) durch 4% FCS ersetzt) gewaschen und für 5-7 Tage in Kultur

gesetzt. Die Kulturproben befanden sich immer im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂. Nach dem Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen wieder stimuliert. Dazu benötigte man die Zugabe der APC's. Als APC's wurden WF-Milzzellen verwendet (bestrahlt mit 30 Gy). Die APC's wurden mit dem RT1.D^uβ(20-44) Peptid für 1,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden sie bei 311g abzentrifugiert und zu der T-Zell-Linie hinzu gegeben. Diese Zyklen der Stimulation wurden mehrmals wiederholt (meistens 3x), bis die gewünschte Anzahl an den peptid-spezifischen T-Zell-Linien erreicht wurde. Diese Antigen-spezifischen T-Zell-Linien wurden im Weiteren charakterisiert.

Die T-Zell-Klone wurden dann aus den RT1.D^uβ(20-44) spezifischen T-Zell-Linien durch eine Verdünnungsreihe gewonnen. Zuerst wurde eine Ausgangskonzentration der T-Zell-Linien von 1x10⁵/ml hergestellt und soweit mit Kulturmedium plus 20% T-Stim Kultur supplement human ohne PHA verdünnt, bis eine Endkonzentration von 50 Zellen/ml, 10 Zellen/ml oder 3 Zellen/ml erreicht wurde. Im Folgenden wurden die Zellen in 96-Flachbodenplatten (Nunc, Wiesbaden) pipettiert (Endkonzentration: 5 Zellen/Well, 1 Zelle/Well bzw. 0,3 Zellen/Well). Anschließend erfolgte die Zugabe von APC's und RT1.D^uβ20-44 Peptid, um ein Wachstum der Zellen zu erreichen. Die Platten befanden sich immer im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂. Unter der Voraussetzung, dass ein Wachstum nach 7 Tagen stattgefunden hatte, wurden 25 µl T-Stim Kultur supplement human ohne PHA pro Well zugegeben. Nach weiteren 7 Tagen erfolgte eine mikroskopische Kontrolle des Zellwachstums. Danach wurden die gefundenen Klone in eine 24-Wellplatte (Nunc) umpipettiert und im Folgenden in Kulturmedium mit APC's und RT1.D^uβ(20-44) Peptid stimuliert. Nach der Charakterisierung der Klone und Feststellung unterschiedlicher Vβ-Fragmente in RT-PCR wurden diese Zellen wieder subkloniert. Für die Subklonierung wurden Zellen in eine Konzentration von 0,3/well verdünnt und wie oben in Kultur gesetzt. Bis die Zellen nur ein Vβ Fragment in der PCR aufwiesen, wurde dieser Vorgang wiederholt und die spezifischen Klone hernach charakterisiert (Abb. 3.2).

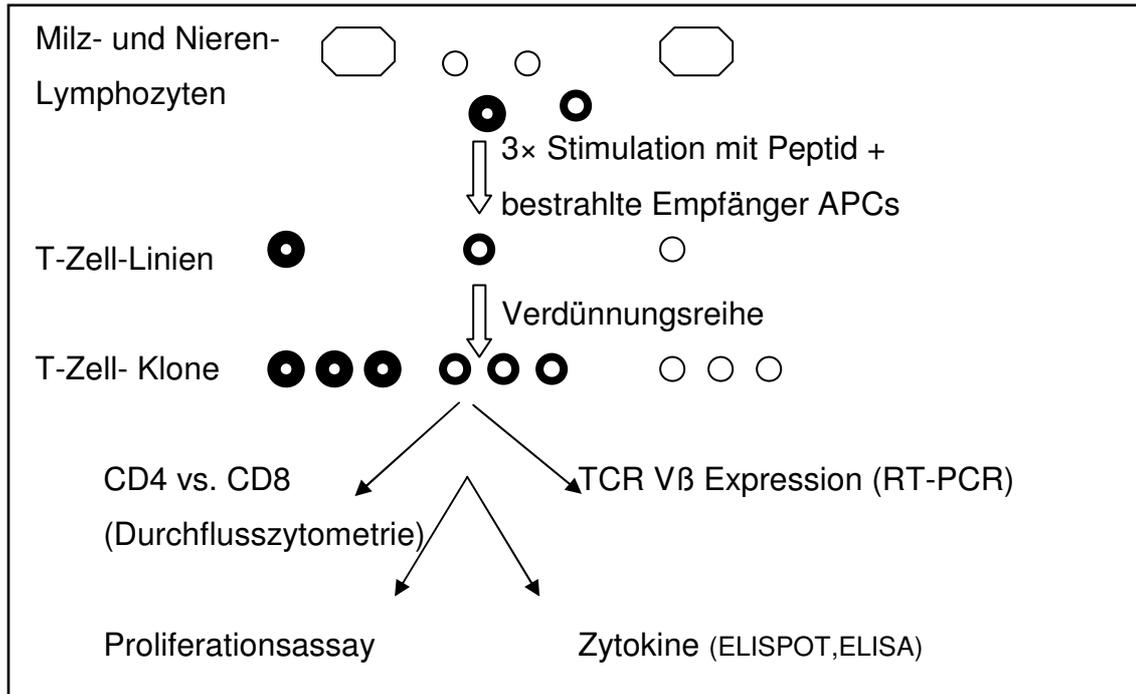


Abb.3.2: Herstellung der T-Zell-Linien und -Klone: Die Lymphozyten wurden von der transplantierten Niere der abstoßenden (Tag 7) oder toleranten (> 100 Tage) LEW-Empfänger und der völlig allogenen WF-Nierenallotransplantate isoliert. Die gewonnenen Lymphozyten aus den Nieren wurden gleich mit RT1.D^uβ(20-44) Peptid stimuliert. Als APC's wurden WF-Milzzellen verwendet (bestrahlt mit 30 Gy). Diese Zyklen der Stimulation wurden mehrmals wiederholt, (meistens 3x) um T-Zell-Linien zu etablieren. Die T-Zell-Klone wurden dann aus den RT1.D^uβ(20-44) spezifischen T-Zell-Linien durch eine Verdünnungsreihe gewonnen. Bis die Zellen nur ein Vβ Fragment in der PCR aufwiesen, wurde dieser Vorgang wiederholt und die spezifischen Klone hernach charakterisiert (FACS, RT-PCR, Proliferationsassay, ELISPOT, ELISA).

3.3. Tiermodell

3.3.1. Tierhaltung

Bei allen Experimenten wurden durchgängig männliche Inzuchtratten (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) im Alter von acht bis zehn Wochen und mit einem Gewicht von 200-250 Gramm verwendet.

Die Tiere wurden in Laminar-Flow-Schränken (Fa. Scanbur®-Käfigen, Silovej, Denmark) mit Sägemehlstreu bei Wasser und Altromin®-Pressfutter ad libitum gehalten; die Haltungstemperatur betrug 22 ± 2 °C bei einer relative Luftfeuchtigkeit von 50-60%, der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug 12 Stunden. Alle transplantierten Tiere wurden täglich begutachtet; hierbei wurden Gewicht, Körperhaltung, Vigilanz, sowie das Aussehen des Abdomens, der Nase und der Pfoten festgehalten. Besonderes Augenmerk wurde auf eine mögliche Abstoßungsreaktion gelegt. Bei einer einmaligen Gewichtsabnahme nach Transplantation von

mehr als 20% oder einer kontinuierlichen Abnahme von 2% pro Tag an sechs aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Versuche abgebrochen. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den NIH (National Institution of Health, NIH)-Richtlinien zur Pflege und Verwendung von Labortieren mit dem Harvard Research Committee (Boston, USA) durchgeführt.

3.3.2. Delayed Type Hypersensitivity (DTH)-Reaktion

Verwendet wurde ein adoptives Transfersystem, um die Funktion der Th-Zell-Klone zu untersuchen (43, 44). Responder LEW Ratten wurden intraperitoneal Th1- und Th2-Zell-Klone (20×10^6) injiziert. Nach 5 Tagen erfolgte eine subkutane Injektion mit $10 \mu\text{g}$ RT1.D^u β 20-44 (immunogenes Peptid) oder $10 \mu\text{g}$ RT1.B^u β 20-44 (Kontrollpeptid) Peptid in ein Ohr und bestrahlten (30 Gy) allogenen WF Milz-Zellen (10×10^6) in das andere Ohr. In separaten Experimenten wurde eine Mischung von Th1-Zell-Klonen (10×10^6), $10 \mu\text{g}$ RT1.D^u β 20-44 Allopeptid oder bestrahlten LEW APC's (80×10^6) direkt intradermal in das Ohr der naiven LEW Tiere injiziert. Zwei unabhängige Beobachter maßen die DTH Antworten 48 Stunden nach dem Eingriff mit einer Mikrometer Kalibrierung (Mituyo, Aurora, Illinois, USA). Jede Messung wurde mindestens viermal durchgeführt, und der errechnete Durchschnitt wurde als Ergebnis verwendet. Die Ergebnisse wurden als Δ Ohrstärke vor und nach dem Eingriff ($\times 10^{-2}$ Zoll) errechnet. Eine statistische Datenanalyse wurde mit Hilfe des Student's t-Test durchgeführt.

3.3.3. Techniken der Nieren- und Hauttransplantation

Bei allen Experimenten wurden männliche Inzuchtratten (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) verwendet; Lewis Ratten (LEW, RT1) waren Empfänger von Nierenallotransplantaten und Wistar Ratten (WF, RT^u) Spender.

Rattennierentransplantation: LEW-Ratten erlitten bilaterale Nephrektomien und erhielten heterotope MHC-inkompatible WF-Nierentransplantate. Die Nieren wurden *in situ* mit 3 ml kalter (4 Grad) laktathaltiger Ringer-Lösung gespült und vor der heterotopischen Transplantation in die großen Gefäße des Wirtsabdomens vorübergehend in derselben Lösung gelagert. Der Harnleiter wurde nach Entfernung der linken Niere an den natürlichen Harnleiter anastomosiert. Die rechte natürliche Niere wurde nach zehn Tagen entfernt, um dem Transplantat

Zeit zu geben, sich von jeglicher ischämischen Reaktion zu erholen und eine Überprüfung der Integrität der Harnleiter-Anastomose zu erlauben.

Hauttransplantation: WF Ratten wurden als Allogentransplantat, LEW-Ratten als Syngentransplantat und ACI (RTⁿ)-Ratten als Drittstamm verwendet.

3.3.4. Messung der Nierenfunktion

Um die funktionalen Veränderungen im Laufe der Zeit zu bestimmen, wurde während eines Zeitraums von vier bis 32 Wochen von allen Tieren alle vier Wochen eine Messung der Präzipitation nach der Interaktion mit drei Prozent sulfosalizyklischer Säure (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) bestimmt. Durch Schwärzung wurde unter Gebrauch des Coleman Junior II Spectrophotometers eine Trübheit bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Zusätzlich wurden die Kreatinwerte im Serum durch eine modifizierte Jaffe-Reaktion auf einem Autoanalysator gemessen (911 ; Hitachi, Indianapolis, IN).

3.3.5. Versuchsgruppe für die Herstellung der T-Zell-Linien und -Klone

Für unsere Studie verwendeten wir zwei Tiergruppen.

Die Empfängertiere wurden postoperativ wie folgt nachbehandelt: Tiere der Versuchsgruppe I blieben unbehandelt; diese Tiere entwickelten im Durchschnitt am Tag 7 eine akute Abstossung (n=4). Tiere der Versuchsgruppe II erhielten am Tag 2 post transplantationem als alleiniges Immunsuppressivum einmalig intraperitoneal 0,5 mg CTLA-4 Ig. Die Substanz CTLA-4 Ig wurde von der Fa. Bristol-Myers Squib (Seattle, WA, USA) mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt. Diese Tiere entwickelten eine stabile Transplantatfunktion und überlebten langfristig über 150 Tage (n=4).

3.3.6. Versuchsgruppen für die funktionelle Analyse der T-Zell-Klone in vivo

Nieren von WF-Spendern wurden naiven LEW-Empfängern eintransplantiert (Tab.3.3.6). Neun Gruppen mit acht Tieren in jeder Gruppe wurden untersucht. Die Empfänger von isogenen Nieren dienten als syngene Kontrolle (LEW->LEW, Gruppe 1). LEW-Tiere, denen Transplantate von WF-Ratten eingesetzt wurden, dienten als allogene Kontrolle (Gruppe 2). In den Kontrollgruppen wurde kein einziges Tier mit T-Zell-Klonen behandelt. Bei allen Empfängern der Gruppen 6-

9 (WF->LEW Modell), wurde eine Modifizierung des Standardniedrigdosierung-Cyclosporin (CsA)-Protokolls (Novartis Pharmaceuticals Corporation, E. Hannover, NJ, USA) verwendet. Es wurde CsA verabreicht (1mg/kg Tage 0-3 und 5 mg/kg Tage 4-7, s.c.), um eine frühzeitige funktionale Wirtsaktivität zu hemmen und um einen frühzeitigen Transplantatverlust zu verhindern, ohne dabei die Entwicklung der chronischen Abstoßung und die Wirkung der T-Zell-Klone zu beeinflussen.

Verschiedene Protokolle mit T-Zell-Klonen wurden bei LEW-Ratten verwendet, die Nierentransplantate von WF-Spendern erhielten. Den Empfängern in den Gruppen 7-9 wurden nach einer Transplantation (n=8 Tiere/Gruppe) Th1-, Th2- (jeweils 30×10^6), bzw. mit Th1- (15×10^6) plus Th2- (15×10^6) Zell-Klone intraperitoneal injiziert. Tiere der Gruppe 6, die nur mit CsA behandelt worden waren und bei denen die T-Zell-Klone weggelassen wurden, dienten als Kontrolltiere. Zur Untersuchung der Wirkung der Th1- und/oder Th2-Zell-Klone alleine erhielten die Tiere der Gruppen 3-5 nach der Transplantation (n=8 Tiere/Gruppe) Th1-, Th2- oder Th1 + Th2-Zell-Klone (30×10^6 , intraperitoneal) (Abb. 3.3.6). Die Tiere waren von der Transplantationsfunktion abhängig. Als das Transplantat versagte, erkrankten die Tiere an Urämie. Tiere, die an Urämie erkrankt zu sein schienen, wurden getötet und die Abstoßung wurde am Tag der Tötung definiert. Langfristige funktionelle, strukturelle und molekulare Differenzen wurden nach 260 Tage bewertet.

Tab.3.3.6: Versuchsgruppen: syngene Kontrolle (LEW->LEW, Gruppe 1), allogene Kontrolle (WF->LEW, Gruppe 2). Empfänger der Gruppen 6-9 (WF->LEW Modell) erhielten CsA. Zusätzlich wurden den Empfängern in den Gruppen 7-9, Th1-, Th2- (jeweils 30×10^6), bzw. mit Th1- (15×10^6) plus Th2- (15×10^6) Zell-Klone intraperitoneal injiziert. Tiere der Gruppe 6 (nur CsA) dienten als Kontrolle. Zur Untersuchung der Wirkung der Th1-und/oder Th2-Zell-Klone alleine, erhielten die Tiere der Gruppe 3-5 nach der Transplantation Th1-, Th2- oder Th1 + Th2-Zell-Klone (30×10^6 , intraperitoneal).

GRUPPEN	STAMMKOMBINATIONEN	THERAPIE
1	LEW->LEW	keine
2	WF->LEW	keine
3	WF->LEW	Th1-Zell-Klon (30×10^6)
4	WF->LEW	Th2-Zell-Klon (30×10^6)
5	WF->LEW	Th1+ Th2-Zell Klon (30×10^6)
6	WF->LEW	CsA, 1mg/kg Tag 0-3 und 5mg/kg Tag 4-7, s.c.
7	WF->LEW	Th1-Zell-Klon (30×10^6) + CsA, 1mg/kg Tag 0-3 und 5mg/kg Tag 4-7, s.c.
8	WF->LEW	Th2-Zell-Klon (30×10^6) + CsA, 1mg/kg Tag 0-3 und 5mg/kg Tag 4-7, s.c.
9	WF->LEW	Th1+ Th2-Zell-Klon (30×10^6) + CsA, 1mg/kg Tag 0-3 und 5mg/kg Tag 4-7, s.c.

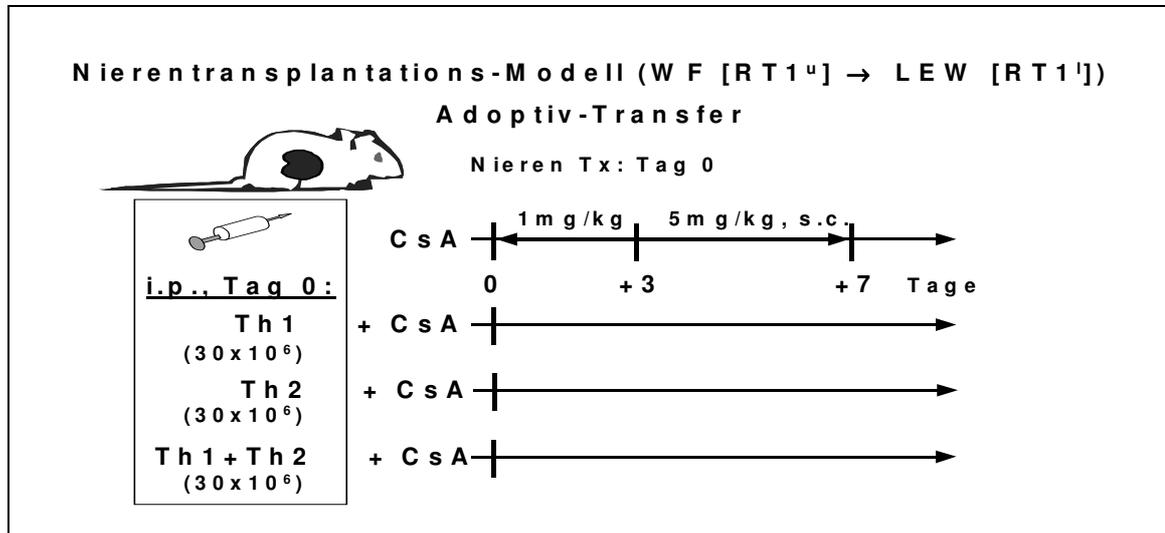


Abb.3.3.6: Schema der Nierentransplantation: Applikation von CsA (1mg/kg Tage 0-3 und 5 mg/kg Tage 4-7, s.c.), um eine frühzeitige funktionale Wirtsaktivität zu hemmen und um einen frühzeitigen Transplantatverlust zu verhindern, ohne dabei die Entwicklung der chronischen Abstoßung und die Wirkung der T-Zell-Klone zu beeinflussen.

3.3.7. Messung der spezifischen Toleranz

Die spezifische Toleranz wurde durch eine Hauttransplantation mit syngenen (LEW), allogenen (WF) Transplantaten und der Haut von Drittstamm (ACI) getestet. Toleranz war an der Akzeptanz des allogenen Transplantates (WF), ohne

Zeichen einer Abstoßungsreaktion erkennbar, die mit der syngenen Kontrolle vergleichbar war. Die Haut von Drittstamm (ACI) wurde akut abgestoßen.

3.4. PCR Analyse der T-Zellrezeptor V β Expression

Den Zellen (5×10^6) wurde die gesamte RNA unter Verwendung des RNase total kit (QUIAGEN Inc., Valencia, California, USA) entnommen und cDNA mit Hilfe des Super Script Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis Kit, unter zur Hilfenahme der Random Primer (Life Technologies Inc., Gaithersburg, Maryland, USA), präpariert. Die PCR-Amplifikation mit dem GAPDH *housekeeping-Gen* wurde durchgeführt, um die Veränderungen in der gesamten cDNA-Konzentration zwischen den Proben festzustellen. Eine RT-PCR wurde durchgeführt, um die Expression des TCR V β Repertoires in naiven Milzorganen sowie der T-Zell-Linien und -Klone zu vergleichen. Verwendet wurden 5' Primer, spezifisch für jeden der 22 Ratten TCR V β und für jeden der 24 Human-TCR V β und eine 3' Primer für die RTC β .1 der TCR C β -Region (43). Sich nicht überlappende oligonukleide Primerpaare wurden von Genosys Biotechnologies (The Woodlands, Texas, USA) geliefert. Zu den Reaktionsbedingungen gehörten 1.25 μ l cDNA, 1 μ M jedes der 5' und 3' Primer, 10mM Tris-HCL, 50 nM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (wt/vol) Gelatine, 800 μ M dNTPs und 0.625 Einheiten Ampli Taq DNA Polymerase (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, California, USA) in einem Gesamtvolumen von 25 μ l. Die Amplifikationen wurden in einem Thermocycler (Gene Amp. PCR System 9600, Perkin-Elmer Applied Biosystems) durchgeführt. Für jeden Primer wurden ein verschiedener thermaler Parameter wie folgt verwendet: 15 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 20 Sekunden Glühtemperatur zwischen 50 °C und 60 °C und eine Verlängerung von 1 Minute (mit einer endgültigen Verlängerung von 7 Minuten am Ende aller Zyklen). Eine PCR-Analyse wurde bei allen cDNA-Proben doppelt durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden auf 1% Agarose-Gel separiert (43, 44).

3.5. ELISPOT-Testverfahren

Zur Erkennung der Zellen, die IFN- γ und IL-10 in den Gruppen 6-9 produzieren, wurden die Tiere bei einem Nierenversagen getötet. Es wurden 96 well ImmunoSpot Platten (NUNC, Wiesbaden) über Nacht in einem „Befeuchter“ bei 4 °C mit 100 μ l/well Antikörper in steriler PBS beschichtet (4 μ g/ml Anti-Ratte IFN- γ

(OptEIAM set, BD PharMingen, Heidelberg) oder 2 µg/ml Maus Anti-Ratte IL-10 (2G101H7 Klon, Biossource International, Camarillo, CA). Zur Erkennung von IFN-γ und IL-10 Produzenten, wurden die Platten zunächst gewaschen; ly-sierte (ACK Lysing Buffer, BioWittacker, Walkersville, MD) Milzzellen (5×10^5) aus Tieren der Gruppe 6-9, wurden mit einer Lyse aus 5×10^5 bestrahlt (30 Gy) Milzzellen aus naiven WF-Ratten unter Beigabe oder Weglassen von 1 µg/well Concanavalin A (ConA, positive control, Sigma) in einem RPMI 1640 Medium kultiviert. Bestrahlte Milzzellen aus Tieren der Gruppen 6-9, die getrennt getestet wurden, dienten als negative Kontrolle. Nach einer Inkubation (24 Std. für IFN-γ- oder 48 Std. für IL-10) bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Platten gewaschen und mit 100 µl/well (6 µg/ml) Maus Anti-Ratten Biotin konjugiertem Ak (Antikörper) (A96B 1A3 1E2 Klon, Biossource International, Camarillo, CA) in PBS-TWEEN (0,05% Polyoxethylen-Sorbitan Mono Laurate, Tween20, Sigma) plus BSA-Fraktion V (1% BSA, Sigma) beschichtet und über Nacht in einem Be-feuchter bei 4° inkubiert. Die Platten wurden gewaschen und anschließend min-destens 2 Std. lang bei Raumtemperatur in verdünntem Streptavidin-HRP (1:2000) inkubiert. Die Platten wurden nochmals gewaschen und unter Anwen-dung einer Visualisierungslösung (3-amino-9-Ethyl Carbazol = AEC, 100 mg AEC in 10 ml N,N-Dimethyl Formamid, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) entwi-kelt. Am Standort der ursprünglichen Zytokinabsonderung wurden „spots“ (=Präzipitation) ersichtlich. Die Spots wurden mit einem automatischen, compu-terassistierten Bildanalysator gezählt, der in der Lage war, die Spots auf der Grundlage der vorbestimmten Größen-, Form- und Farbintensitätseigenschaften zu erkennen (45-47).

3.6. Proliferationstest

Nach der Herstellung der T-Zell-Linien und -Klone, wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen mit 10 µg des relevanten Allopeptids RT1.D^Uβ(20-44) auf einer 96-well U-förmigen Plates (Nunc) kultiviert (diese Dosierung wurde auf der Grundlage einer frühe-ren Publikation gewählt, die eine Dosierungsantwortkurve für die proliferative Antwort der Th-Zell-Klone auf dieses Peptid zeigt (43)). Als Kontrollen wurden Th1- oder Th2- Zellen mit Medium oder mit dem Kontrollpeptid RT1.B^Uβ(20-44) verwendet. Das RPMI 1640 Medium (BioWhittaker Inc.) enthielt 10% FCS, 100 U/ml Penizillin, 100mg/ml Streptomycin, 2×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 5 mM

HEPES in Anwesenheit bestrahlter Selbst-Antigen präsentierender Zellen (1×10^5). Die Proliferation wurde durch eine $^3\text{[H]}$ -Thymidin - (New England Nuclear Dupont, Boston, Massachusetts, USA) Inkorporation gemessen. Alle Tests wurden vierfach durchgeführt und die Ergebnisse in $\text{cpm} \pm \text{SEM}$ ausgedrückt.

3.7. Zytokin-Genexpressionsanalyse in Nieren-Allotransplantaten - RNase Protectionassay

Die zu untersuchenden Transplantate wurden in kleine Stücke geschnitten und mit einem Homogenisator in RNAzolTM (Fa. Qiagen) komplett homogenisiert. Unter Zugabe von Chloroform (Fa. Sigma) wurde die RNA extrahiert und anschließend mit Isopropanol (Fa. Sigma) präzipitiert. Ein Cocktail radioaktiv markierter $\alpha^{32}\text{P}$ -RNA-Sonden der Zytokine IL-2, 3, 4, 5, 6, TNF- α , β und IFN- γ wurde mit Hilfe der Zytokin-Schablone synthetisiert. Dazu wurde die Transkriptionsreaktion mit der DNA-Zytokin-„Schablone“ und radioaktiv markierten Trinukleotiden angesetzt. Nach 1 h Inkubation wurde DNase hinzugefügt, um die Schablone zu entfernen. Anschließend wurde die RNA-Sonde durch Natriumacetat und Ethanol (Fa. Pharmaco, Karben, Deutschland) gefällt. Der RNase Protektions-Assay wurde in mehreren Schritten durchgeführt: Die markierte Sonde wurde mit der gewonnenen Transplantat-RNA in Hybridisierungslösung gemischt, bei 95 °C denaturiert und über Nacht bei 56 °C hybridisiert. Ungeschützte Ein-Strang-RNA wurde nachfolgend durch RNase-Verdau abgebaut. Nach Stoppen dieser Reaktion wurden die hergestellten Fragmente durch Ethanol gefällt, in Puffer (RPA IIITM Kit, Ambion, Texas, USA) aufgenommen und bei 95 °C denaturiert. Die Fragmente wurden in einem Acrylamidgel (Sequa[®] Gel, National Diagnostics, Atlanta, USA) aufgetrennt. Dieses Gel wurde mit einem Röntgenfilm (Fa. Fujifilm, Düsseldorf) für 72 Stunden bei -80 °C aufbewahrt. Abschließend wurden die Röntgenfilme eingescannt und mittels NIH-Software, die Expression der jeweiligen Zytokine ausgewertet indem die relative Schwärzung des Röntgenfilms für jedes Zytokin berechnet wurde.

Alle Produkte stammen, falls nicht anders angegeben, aus dem MaxiscriptTM Kit und RPA IIITM Kit der Firma Ambion[®], USA). Die DNA Zytokin-„Schablone“ (rCK-1 Multi-Probe Template Set) wurde von der BD Pharmingen bezogen.

3.8. Real Time PCR Analyse

Die Expression von repräsentativen Chemokinen und Wachstumsfaktoren, MCP-1 und TGF-1 β , die bei dem RNase-Protectionsassay nicht gemessen werden konnten, wurden zusammen mit IL-1 β und TNF- α durch die Real Time PCR (quantitative Polymerase Ketten-Reaktion) in Nierenallotransplantaten (n=6/Gruppen) der Gruppen 1 und 6-9 gemessen. Die gesamte RNA wurde von dem schockgefrorenem Nierengewebe mit Hilfe einer Säure Guanidium Isothiocyanat-Phänol Chloroform Extraktionsmethode entnommen (48). cDNA wurde unter Anwendung von 2 μ g hitzedenaturierter RNA präpariert. Die folgenden Sequenzen wurden verwendet (Sigma Gnosys Woodlands, Texas, USA): GAPDH; 5'-ATG GCA CAG TCA AGG CTG AGA-3' und 5'-CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT-3'; TGF- β , 5'-GCT GCT GAC CCC CAC TGA T-3' und 5'-GCC ACT GCC GGA CAA CTC-3'; MCP-1, 5'-CAG ATC TCT CTT CCT CCA CCA CTA T-3' und 5'-CAG GCA GCA ACT GTG AAC AAC-3'; TNF- α 5'-ACA AGG CTG CCC CGA CTA C-3' und 5'-TCC TGG TAT GAA ATG GCA AA-3'; und IL-1 β , 5'-TGC ACT ACA GGC TCC GAG ATG-3' und 5'-TGG AGA GCT TTC AGC TCA TAT GG-3'. Die Primer wurden unter Anwendung der Primer Express Software für Primerdesign gestaltet, um die kurzen Segmente der 50-150 Basissaare der vorgegebenen cDNA zu erweitern. Eine optimale Primerkonzentration wurde durch die Durchführung der Primertitration erreicht.

Eine quantitative Real Time PCR wurde in einer zwei-Schritt-RT-PCR unter Anwendung von SYBR Green PXR Master Mix (PE Biosystems, Foster City, CA) mit 100 ng cDNA und 300 nM Primern, in einem Gesamtreaktionsvolumen von 50 μ l durchgeführt. Der PCR-Thermalzyklus bestand aus zehnminütigem Erhitzen auf 95°, gefolgt von 40 fünfzehnssekündigen Erhitzungszyklen auf 95° und einer sechzigsekündigen Abkühlung auf 60°. Genspezifische Produkte wurden kontinuierlich mit Hilfe des ABI Prism 7700-Sequenzdetektors (Applied Biosystems) gemessen und die relative Quantität, wie vom Hersteller empfohlen, kalkuliert. Alle Muster wurden in Duplikaten ausgeführt und während der Datenanalyse durch den Passive Reference-Farbstoff von SYBR Green PC Master Mix normalisiert, um well-zu-well fluoreszierende Lösungen zu korrigieren. Um die Zielvorlage mengenmäßig zu bestimmen, wurde der durchschnittliche CT-Wert (Schwellenzyklus), also die Anzahl der Zyklen, innerhalb derer die Fluoreszenz des Reporters eine fixierte Schwelle oberhalb der Basiswerte erreicht, bemes-

sen. Dann wurde die Differenz (ΔCT) zwischen den durchschnittlichen Ct-Werten der Muster in den vorgegebenen Wells und denen des *housekeeping-Gens* GAPDH gemessen; die Berechnung der Differenz ($\Delta\Delta CT$) zwischen den durchschnittlichen ΔCt -Werten der Muster für jedes Ziel und der ΔCt -Wert des Kontrollmusters für dieses Ziel folgten. Dieser relative Quantifizierungswert wird als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ausgedrückt.

3.9. Histologische und Immunhistologische Analyse

3.9.1. Histologische Untersuchungen (Morphologie)

Für die morphologische Analyse wurden die Nierentransplantate aller Versuchsgruppen nach Zeichen der chronischen Abstoßung oder 200-250 Tage nach der Transplantation (Abb.4.4.6.1a) in 10% gepufferten Formalin fixiert. Paraffinschnitte wurden mit Hilfe von Hämatoxylin und Eosin (BioOptika, Mailand, Italien) Periodsäure-Schiff (PAS) (BioOptika), Trichrome (BioOptika) und Elastinfärbung (BioOptika) ausgewertet.

3.9.2. Immunhistologischer Nachweis von mononukleären Zellinfiltraten, der Expression von IFN- γ und IL-10 und des Transkriptionsfaktors GATA-3 und des Th2-Markers T1/ST2

Ein weiterer Anteil aller allogenen und isogenen Transplantate (Gruppe 1 und 6-9) wurde zum Zeitpunkt der Entfernung für die histomorphologische Untersuchung in 10% gepuffertem Formalin fixiert. Zusätzliche Teile aller Nierentransplantate wurden schockgefroren und bei -80°C für einen RNase Protektionstest und eine Real time PCR gelagert. Paraffinschnitte wurden mit Hilfe von Hämatoxylin und Eosin, Periodsäure-Schiff (PAS), Masons Trichrome für Kollagenase, und Verhoeffs Elastin für elastische Faserfärbung ausgewertet. Masons Trichrome gefärbte Schnitte wurden auf die Existenz von Fibrose untersucht. Ein semiquantitatives Auswertungssystem zur Einstufung der Fibrose wurde von 0-3 gestaffelt, wobei 0,1,2 und drei jeweils eine minimale, milde, moderate und starke Fibrose anzeigten. Eine ähnliche Skala wurde zur Einstufung des Grades der interstitiellen mononukleären Zelleninfiltration verwendet, wobei zwei voneinander unabhängige Prüfer die Proben untersuchten.

Für die Immunhistologie wurden die Kryostatschnitte in Paraformaldehyd-Lysin-Periodat fixiert, wobei die Zelloberflächenantigene markiert wurden. Nach Fixie-

nung in Aceton erfolgte die Lokalisierung der Zytokine mit Hilfe einer Peroxidase-Antiperoxidase Methode (49). Monoklonale Antikörper (mAk) wurden von Serotec (Düsseldorf), andernfalls wurde dies angemerkt, erworben und gegen alle Ratten-T-Zellen (T-Zellen Rezeptor- α/β , R73), CD4 (W3/25), CD8 (OX-8), und Makrophagen (ED-1) eingesetzt. Die Zytokinexpression wurde unter Verwendung von mAbs IL-4 (IL-4, OX-81), IL-10 (A5-4, R&D, Minneapolis, MN) und Interferon- γ (IFN- γ , DB-10, P. van der Meide, Rijswijk, Holland) bestimmt. Eine zusätzlich Kennzeichnung erfasste einen monoklonalen Antikörper anti - Ratte GATA-3 (Santa Cruz, San Diego, CA) und einen affinitätsgereinigten anti-T1/T2 Kaninchenantikörper, der gegen einen rekombinierenden mausartigen T1/ST2 gezüchtet worden war (50). Kontroll-mAk, Kaninchen-IgG und sekundäre Antikörper wurden von BD PharMingen (San Diego, CA) erworben. Isotyp-matched-mAk und Kaninchen-IgG wurden in jedes Experiment mit einbezogen.

3.9.3. Immunhistologische Analyse der co-stimulatorischen Signale

Zusätzlich wurden Anteile der Nierentransplantate schockgefroren und für die Immunhistologie bei -80°C gelagert (Kryostatschnitte).

Für die Immunhistologie wurden zuerst Einzelfärbungen, anschließend Doppelfärbungen an LEW-Rattengewebe durchgeführt, um die Qualität der AK und deren Konzentration (in $\mu\text{g}/\text{ml}$) für eine optimierte Reaktion mit dem Gewebe auszutesten. Zudem wurde ermittelt, welcher AK mit welcher Konjugation (Markerenzym), entweder Meerrettichperoxidase (HRP, Horseradish Peroxidase) oder alkalische Phosphatase (AP), die beste Bindung darstellt. Um die Zelloberflächenantigene sichtbar zu machen, wurde hierbei eine für das Rattenmodell neue Doppelfärbemethode entwickelt. Mittels dieser sequentiellen immunenzymatischen Doppelfärbung konnten auf dem Rattengewebe erstmalig zwei verschiedene Antigene sichtbar gemacht werden. Das Prinzip dieser Färbung besteht aus jeweils zwei eigenständig sukzessiv ablaufenden so genannten indirekten Nachweismethoden (51). Das heißt, es bindet ein spezifischer aber unkonjugierter Primär-AK an das Gewebe, welcher in einem nächsten Schritt mit einem entweder HRP- oder AP-konjugierten Sekundär-AK gebunden und sichtbar gemacht wird. Zunächst wurden die Gefrierschnitte 10 Minuten in Aceton (Fa. Merck, Darmstadt) fixiert und anschließend luftgetrocknet. Der erste unkonjugierte Primär-AK wurde über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C

inkubiert. Nach Waschen des Gewebes in 0,5 %igem BSA (Fa. Merck, Darmstadt) TRIS-HCl (Fa. Merck, Darmstadt)-NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)-Puffer, der mit einem pH-Meter (Fa. WTW, Darmstadt) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde, wurde dem (HRP-) konjugierten (polyklonalen) Sekundär-AK, der spezifisch gegen die Tierspezies des Primär-AK gerichtet ist, 60 Minuten gegeben, um an diesen zu binden. Dieser (erste) Enzym-Substrat-Komplex wurde nun mit einem Chromogen (Fa. Biogenex, Liquid DAB, San Ramon, CA, USA), der sich auf dem Gewebe in einem 'bräunlichen Farbton' darstellt, sichtbar gemacht (Abb. 3.9.3a).

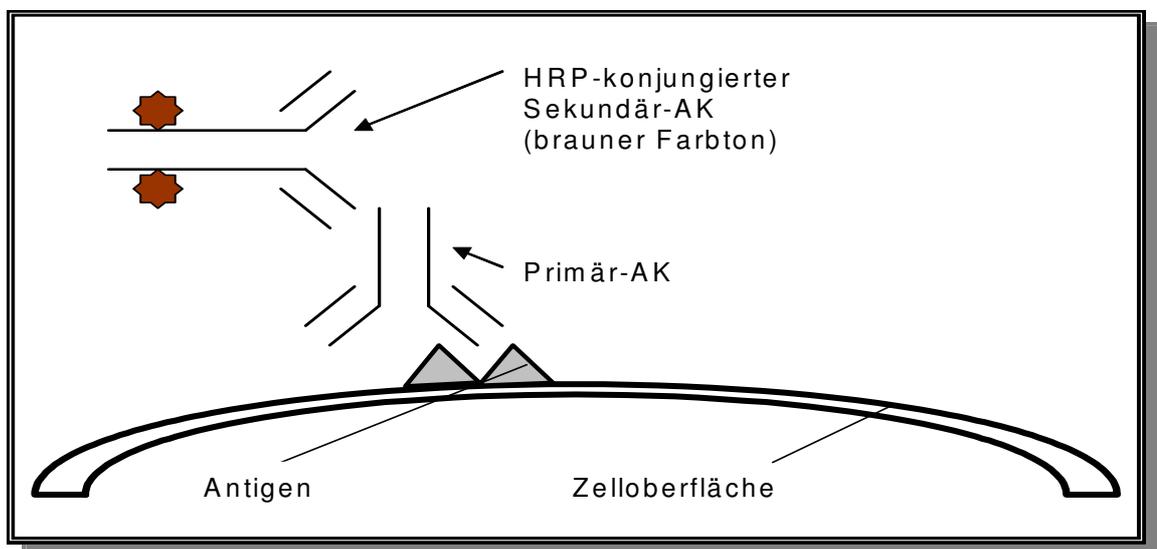


Abb.3.9.3a: Schematische Darstellung der indirekten Nachweismethode mit dem ersten Enzym-Substrat-Komplex, bestehend aus Primär- und Sekundär-AK. Die HRP-Konjugation stellt sich auf dem Gewebe als bräunlicher Farbton dar. HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); AK, Antikörper.

Darauf folgend wurde nach einem Säure-Eluierungsschritt (Dako, Hamburg) diese indirekte Nachweismethode wiederholt, um Kreuzreaktionen mit den Reagenzien der folgenden zweiten Färbesequenz zu verhindern (52). Der Unterschied besteht jedoch darin, dass für den zweiten Sekundär-AK eine AP-Konjugation besteht und dieser mit einem anderen Chromogen (Fa. Dako, Fast Red, Hamburg) angefärbt wurde. Dieser 2. Enzym-Substrat-Komplex stellt sich auf dem Gewebe als 'roter Farbton' dar (vgl. Abb. 3.9.3b).

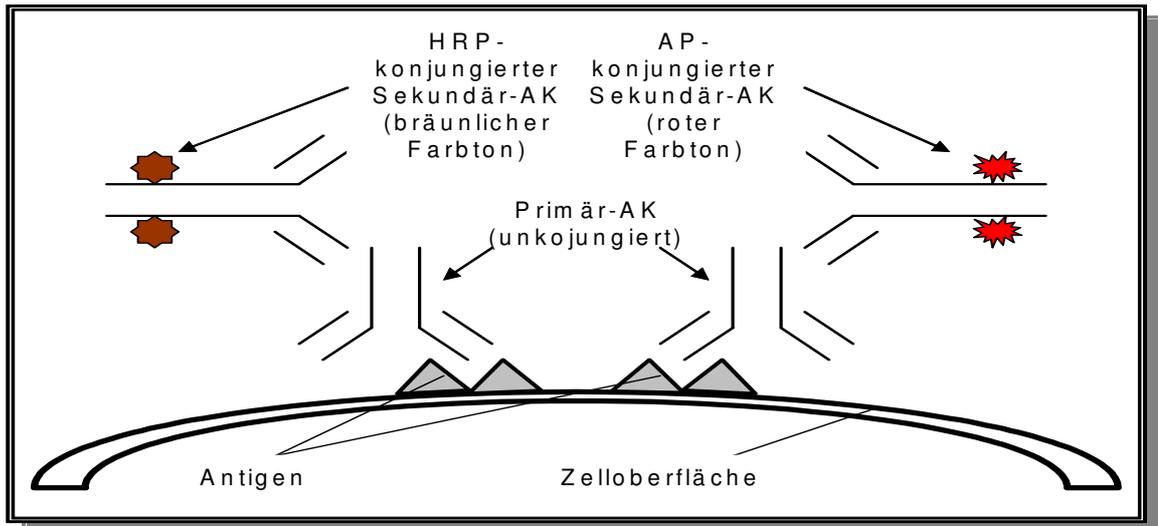


Abb.3.9.3b: Schema der fertigen immunenzymatischen Doppelfärbung am Rattengewebe. Dargestellt ist die Bindung der Primär-AK und der HRP- (bräunlicher Farbton) bzw. AP- (roter Farbton) konjugierten Sekundär-AK. HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); AP, alkalische Phosphatase; AK, Antikörper.

Nach abschließend zweiminütiger Gegenfärbung in wässrigem Hämalaun, bestehend aus 2,4 g Hämatoxilin (Fa. Merck, Darmstadt), 0,4 g Natriumjodat (Fa. Merck, Darmstadt), 100 g Kaliumaluminiumsulfat (Fa. Applichem, Hartenstein, Würzburg), 2 g Zitronensäure (Fa. Merck, Darmstadt) und 2000 ml destilliertem Wasser (Fa. Delta-Pharma, Pfullingen), wurde das Gewebe mit Glycergel (Fa. Dako, Hamburg) fixiert.

Um Kreuzreaktionen zwischen den Reagenzien der ersten (HRP-) und zweiten (AP-) Färbesequenz zu verhindern, wurde außer dem erwähnten AK-Eluierungsschritt zwischen den einzelnen Färbesequenzen DAB als Chromogen im ersten Färbeschritt verwendet. Dies hat eine Abschirmung des Immunkomplexes durch das Reaktionsprodukt, den so genannten 'Shielding-Effekt', zur Folge (53). Wenn beide Antigene sehr nahe nebeneinander lokalisiert sind, kann es jedoch nach Färbung des ersten Antigens zu einer Abdeckung des zweiten zu markierenden Antigens kommen.

Um eine unspezifische Hintergrundfärbung und damit eine falschpositive Reaktion durch das Chromogen (Liquid DAB in der ersten-, Fast Red in der zweiten Färbesequenz) zu verhindern, wurden die Primär-AK mit 0,5%igem BSA-TRIS-HCl-NaCl-Puffer verdünnt. Die Möglichkeit einer falschpositiven Reaktion besteht bei Gefrierschnitten auch in der endogenen AP-Enzymaktivität, beispielsweise in Gefäßen. Durch Substitution von Levamisol-Lösung (Fa. Dako, Hamburg) zum Chromogen der zweiten Färbesequenz Fast-Red (Fa. Dako, Ham-

burg), wurde auch dies verhindert. Auch durch die Verdünnung des Sekundär-AK mit Rattenserum (Fa. Biozol, Eching) wurden falschpositive Reaktionen mit diesem und dem Gewebe verhindert.

Tabelle 3.9.3a gibt einen Überblick über die verwendeten Primär-AK, deren Antigen mit Funktion sowie über Zellen die dieses Antigen exprimieren. Dazu passende Sekundärantikörper finden sich in Tabelle 3.9.3b.

Tab.3.9.3a: Primärantikörper – Vorkommen und Funktion.

CD-ANTIGEN (SYN.)	ZELLEN, DIE DAS AG EXPRIMIEREN	FUNKTIONEN	FA.
α/β TCR	T-Zellen (90%)	Erkennung fremder Antigene (→intrazelluläre Signalübertragung→ aktivierter Zustand)	Fa.Biozol, Eching, BZL03073 (Maus)
CD4	Einige Gruppen von Thymozyten, T-Helferzellen, inflammatorischen T-Zellen (etwa 2/3 der perph. T-Zellen), Monozyten, Makrophagen	Co-rezeptor für MHC-Klasse-II Moleküle (Rezeptor für gp120 von HIV-1 und HIV-2)	Fa.Serotec, Düsseldorf, MCA55R (Maus)
CD8	Einige Gruppen von Thymozyten, zytotoxische T-Zellen (etwa 1/3 der peripheren T-Zellen)	Co-rezeptor für MHC-Klasse-I Moleküle	Fa.Pharmingen, Heidelberg, CD8a:22071D (Maus) CD8b22501D (Maus)
CD25	Aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten	α -Kette des IL-2 Rezeptors ; assoziiert mit CD122 (NK-Zellen, ruhende Untergruppe von T-Zellen, einige B-Zell-Linien) und der IL-2R γ -Kette	Fa.Serotec, Düsseldorf, MCA494G (Maus)
CD28	Untergruppe von T-Zellen (CD4 und CD8 T-Zellen), aktivierte B-Zellen	Aktivierung naiver T-Zellen; Rezeptor co-stimulierendes Signal (Signal 2); bindet B7.1 und B7.2	Fa.Serotec, Hamburg, MCA1331 (Maus)
CD45RA	B-Zellen, Untergruppe von T-Zellen (naive/ruhende CD4 T-Zellen), Monozyten	(komplexe Rolle der) T-Zell- und B-Zell-Antigen Signaltransduktion	Fa.Biozol, Eching, BZL02974 (Maus)
CD45RC	B-Vorläuferzellen, B-Zellen, Untergruppe von CD4 T- Zellen (Gedächtniszellen), aktivierte T-Zellen, CD8 Suppressor- und zytotoxische T-Zellen	(komplexe Rolle der) T-Zell- und B-Zell-Antigen Signaltransduktion	Fa.Pharmingen, Heidelberg (Maus)
CD 80 (B7.1)	Untergruppe aktivierter B-Zellen, APC	Co-stimulator – Optimierung der T-Zell Aktivierung; Ligand für CD28 und CTLA-4	Fa.Serotec, Düsseldorf (Maus)

CD86 (B7.2)	Monozyten, aktivierte B-Zellen, dendritische Zellen (APC)	Co-stimulator – Optimierung der T-Zell Aktivierung; Ligand für CD28 und CTLA-4; B-Zellaktivierung	Fa.Serotec, Düsseldorf (Maus)
CD 95 (FAS)	Vielzahl von Zell-Linien; Lymphozyten bei HIV; in vivo Verteilung unbekannt/ nicht hinreichend geklärt (Herz, Leber, Thymus, Ovarien)	Bindet TNF-ähnlichen Fas-Liganden; induziert Apoptose	Fa.Pharmingen, Heidelberg (Maus)
FAS-Ligand	Sich entwickelnde T-Zellen	Effektormolekül von zytotoxischen T-Zellen	Fa.Pharmingen, Heidelberg, 610410 (Maus)
CD152 (CTLA-4)	Aktivierte T-Zellen (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)	Ligand von B7.1 (CD80), B7.2 (CD86); negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung	Fa.SantaCruz, USA, sc-9094 (Hase)
ED1	Makrophagen, Monozyten	Säurephosphataseaktivität	Fa.Serotec, Düsseldorf, MCA341R (Maus)
Ox3 (MHC-Klasse II)	B-Zellen, CD4 T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen	Antigenpräsentation (→ intrazelluläre Signalübertragung→ aktivierter Zustand)	Fa.Serotec, Düsseldorf, MCA45G (Maus)

Tab.3.9.3b: Verwendete Sekundär-Antikörper.

Wirt (Sek.AK)	gerichtet gegen	konjung. Enzym	Firma
Ziege	Hase	HRP	CALTAG 42007 Burlingen, CA, USA
Hase	Ziege	HRP	DAKO P0160, Hamburg
Hase	Maus	HRP	DAKOP0161, Hamburg
Ziege	Hase	AP	DAKO D 0487, Hamburg
Hase	Maus	AP	DAKO D 0314, Hamburg

3.10. Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden in arithmetischen Mitteln (Mittel±SEM) ausgedrückt. Die statistische Bedeutung zwischen den Gruppen wurde mit Hilfe des Student's t-Tests und des Mann-Whitney-Tests überprüft. Die Differenz wurde mit $p < 0.05$ als bedeutsam bewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der RT1.D^Uβ(20-44) spezifischen T-Zell-Linien und T-Zell-Klone aus abstoßenden und toleranten Tieren

4.1.1. Analyse der T-Zell-Linien

Durch wiederholte Stimulierungen mit RT1.D^Uβ(20-44) Peptid, wurden T-Zell-Linien hergestellt und anschließend auf ihre Reaktivität gegen das immunogene RT1.D^Uβ(20-44) Peptid und RT1.B^Uβ(20-44) Kontrollpeptid in Gegenwart bestrahlter empfängerspezifischer APC's überprüft. Die aus der Niere der toleranten Empfänger hergestellten T-Zell-Linien zeigten, verglichen mit der Reaktivität der T-Zell-Linien aus abstoßenden Tieren (repräsentatives Beispiel für eine von drei Zell-Linien jeder Gruppe, 32,124±876 versus 1,684±286 CPM), eine deutlich niedrigere Reaktivität gegenüber dem RT1.D^Uβ(20-44) Peptid. Die T-Zell-Linien zeigten nach Stimulation mit dem Kontrollpeptid RT1.B^Uβ(20-44) in sämtlichen Gruppen keine signifikante Reaktivität oberhalb des Basalwerts (Abb. 4.1.1).

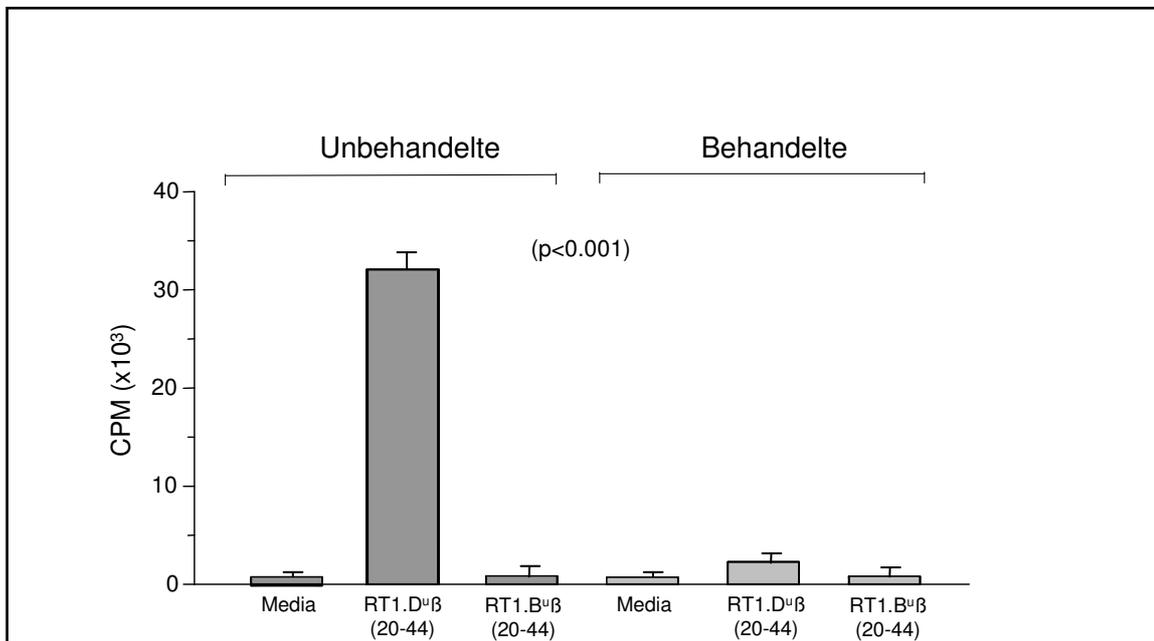


Abb.4.1.1: Vergleich der Reaktivität der T-Zell-Linie aus Tieren mit akuter Abstoßung (Gruppe 1), mit der aus toleranten Tieren (Gruppe 2), gegenüber spenderspezifischen MHC Klasse II Allopeptiden (*p<0.0001 Gruppe 1 versus Gruppe 2). Aus jeder Gruppe wurden drei Zell-Linien hergestellt (repräsentatives Beispiel aus einer Zell-Linie Gruppe 1, bzw.2. Gegenüber dem nicht-spezifischen Peptid (RT1.B^Uβ(20-44) zeigte sich bei beiden Zell-Linien keine signifikante Reaktivität; dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

4.1.2. Analyse der T-Zell-Klone

Aus den T-Zell-Linien wurden, wie unter 3.2. beschrieben, nach dreimaliger Stimulierung mit dem RT1.D^uβ(20-44) Peptid, in Anwesenheit bestrahlter LEW APC's, T-Zell-Klone durch Verdünnungsreihen etabliert. Aus jeder Zell-Linie der Gruppen 1 und 2 wurden jeweils fünf T-Zell-Klone hergestellt und auf ihre Reaktivität gegenüber dem spenderspezifischen MHC Klasse II Allopeptid getestet. Die T-Zellen-Klone aus dem Tier mit akuter Abstoßung zeigten im Poliferationssassay eine deutlich spezifische Reaktivität gegenüber dem Allopeptid (Proliferationen zwischen 33.989 ± 7.968 und 41.593 ± 4.153 cpm, Tab. 4.1.2). Im Vergleich dazu wiesen die T-Zell-Klone aus dem toleranten Empfängertier nur eine minimale Reaktivität gegen das Peptid auf (Proliferation zwischen 2.979 ± 583 und 4.240 ± 749 cpm). Gegenüber dem Kontrollpeptid RT1.B^uβ(20-44) zeigte sich in beiden Gruppen der T-Zell-Klone aus abstoßenden versus toleranten Tieren eine von der Hintergrund-Aktivität nicht signifikant abweichende Basis-Reaktivität.

Tab.4.1.2: Charakterisierung der T-Zell-Klone aus der Niere bei akut abstoßenden und toleranten Tieren. Die T-Zellen-Klone aus dem Tier mit akuter Abstoßung zeigten eine deutliche spezifische Reaktivität gegenüber dem Allopeptid. Im Vergleich dazu wiesen die T-Zell-Klone aus dem toleranten Empfängertier nur eine minimale Reaktivität gegen das Peptid auf. Gegenüber dem Kontrollpeptid RT1.B^u β(20-44) zeigte sich in beiden Gruppen der T-Zell-Klone aus abstoßenden versus toleranten Tieren eine von der Hintergrund-Aktivität nicht signifikant abweichende Basis Reaktivität.

KLONE		PROLIFERATION ^A		PHÄNOTYP ^B	TCRVβ ^C
	Medium	RT1.D ^u β20-44	RT1.B ^u β20-44		
Abstoßend					
2A2	937±283	34784±3326	1543±258	CD4 +	5.2
2F7	903±217	33989±7968	1560±273	CD4 +	8.1
1F8	947±342	38078±1898	1628±168	CD4 +	8.2
2D5	895±297	38975±5098	1693±286	CD4 +	8.2
1G9	964±385	41593±4153	1615±228	CD4 +	9
Tolerant					
2F3	809±306	3329±827	863±381	CD4 +	3.3
2F5	877±312	3448±943	920±307	CD4 +	4
1D2	936±239	3831±1026	983±493	CD4 +	8.2
2B5	847±437	4240±749	936±304	CD4 +	9
2A7	908±396	2979±583	1003±295	CD4 +	13

^aCounts per minute (CPM±SEM), ^bPhänotyp durch Durchflußzytometrisch (FACS) Analyse,

^cTCR Vβ durch RT-PCR

4.1.3. Phänotypische Charakterisierung der T-Zell-Linien und -Klone

Alle aufgeführten T-Zell-Linien und -Klone exprimierten durchflußzytometrisch nach Färbung mit anti-CD4 und anti-CD8 monoklonalen Antikörpern das CD4-Molekül auf ihrer Oberfläche (Tab.4.1.2). Aus den Zellkultur-Überständen der Zell-Linien und -Klone wurde nach Stimulierung mit RT1.D^uβ(20-44) oder dem RT1.B^uβ(20-44) Kontrollpeptid im ELISA-Testverfahren die Expression von IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-10 und der Fibrose-induzierende Wachstumsfaktor TGF-β untersucht. Die Zellen der T-Zell-Linie und der -Klone aus dem Tier mit Abstoßung produzierten IL-2 und IFN-γ (Th1 typische Antwort) jedoch kein IL-4 und IL-10, während Zellen der T-Zell-Linie und der Klone des toleranten Tieres, IL-4 und

IL-10 (Th2 typische Antwort) produzierten jedoch kein IL-2 und IFN- γ (Abb.4.1.3a und Abb.4.1.3b). TGF- β wurde nicht detektiert.

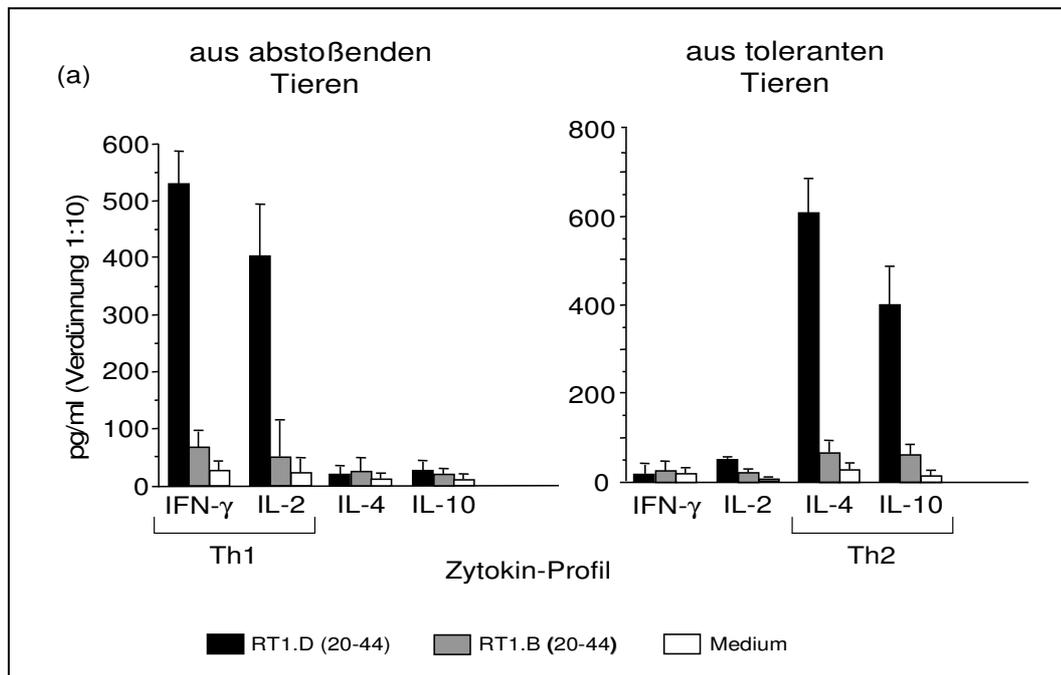


Abb.4.1.3a: Die Zellen der T-Zell-Linie aus dem Tier mit Abstoßung produzierten mehr IL-2 und IFN- γ (Th1 typische Antwort), während Zellen der T-Zell-Linie des toleranten Tieres mehr IL-4 und IL-10 (Th2 typische Antwort) produzierten.

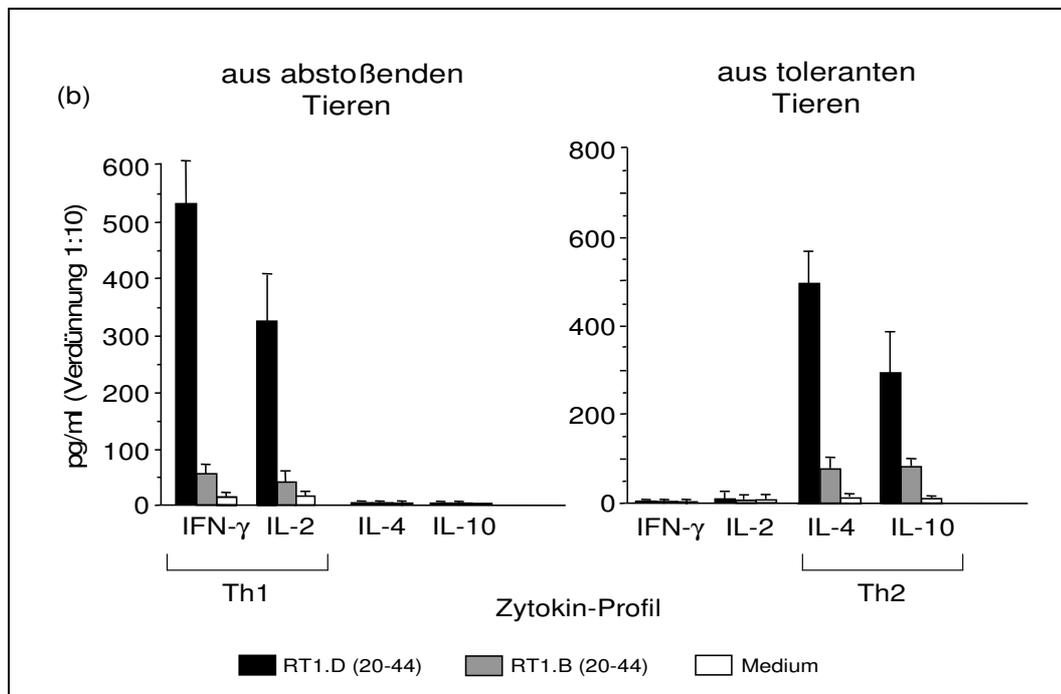


Abb.4.1.3b: Die Zellen der T-Zell-Klone aus dem Tier mit Abstoßung produzierten mehr IL-2 und IFN- γ (Th1 typische Antwort), während Zellen der T-Zell-Klone des toleranten Tieres mehr IL-4 und IL-10 (Th2 typische Antwort) produzierten.

Die Ergebnisse weisen zusammenfassend auf eine Th1-typische Immunantwort bei Tieren mit akuter Abstoßung und ein Th2-typisches zelluläres Reaktionsmuster bei langzeittoleranten Tieren hin.

4.1.4. Charakterisierung des T-Zellrezeptor-V β -Gen-Repertoires der T-Zell-Klone

Die T-Zell-Klone wurden in der RT-PCR anhand spezifischer Primer für die V β -Regionen auf ihre T-Zellrezeptor (TCR)-V β -Gen-Expression untersucht. Die Klone aus abstoßenden, wie auch aus toleranten Tieren, wiesen ein restringiertes V β -Gen-Repertoire auf.

4.2. Funktionelle Untersuchung der Th2-Zell-Klone in vitro

Eine der möglichen funktionellen Bedeutungen der Th2-Zellen besteht in deren regulatorischen Einflussnahme auf Th1-Zellen im Rahmen der Immunantwort. Um dieses für die etablierten Th2-Zell-Klone zu überprüfen, wurde ein Zellkultur-System in vitro verwendet. Es wurden bestrahlte Zellen (30 Gy) des TCRV β 9 exprimierenden Th2-Klons aus dem toleranten Tier in einem 1:1 Verhältnis mit V β 9 exprimierenden Th1-Zell-Klon aus dem akut abstoßenden Tier in Anwesenheit bestrahlter LEW APC's (30 Gy) sowie spezifischem Allopeptid, co-kultiviert. Die Zugabe von bestrahltem Th2-Klon, spezifisch für das RT1.D^u β (20-44) Peptid, reduzierte die Reaktivität der Th1-Zell-Klon mit Spezifität für dasselbe Peptid bei Stimulierung mit RT1.D^u β (20-44) Peptid signifikant (46.900 ± 3470 vs. 20.560 ± 1650 , $p < 0.0001$) (Abb.4.2). Keine signifikante Veränderung der Reaktivität zeigte sich jedoch, wenn bestrahlte Th2-Zellen mit Spezifität für RT1.D^u β (20-44) Peptid alleine mit dem Peptid in vitro stimuliert wurden.

Die Untersuchung der exprimierten Zytokine des Th1-Zell-Klons aus den Überständen dieses Zellkultur-Systems ergab unter Zugabe von bestrahltem Th2-Zell-Klon eine reduzierte Produktion von IFN- γ um 78,2% ($761,5 \pm 107,7$ vs. $169,2 \pm 30,8$ pg/ml), nicht jedoch von IL-2 ($461,5 \pm 153,8$ vs. $384,6 \pm 61,5$ pg/ml) (Abb.4.2). Trotz effektiver Unterdrückung der Proliferation durch vorausgegangene Bestrahlung exprimiert Th2-Zell-Klon verglichen mit nicht vorbestrahltem Klon nahezu unverändert IL-4 und IL-10 nach jeweiliger alleiniger Stimulierung mit dem Allopeptid (nicht vorbestrahlt vs. vorbestrahlt; IL-4: $30,8 \pm 15,3$ vs. $461,5 \pm 38,5$ pg/ml; IL-10: $34,3 \pm 17,2$ vs. $276,9 \pm 61,5$ pg/ml) (Abb.4.2)).

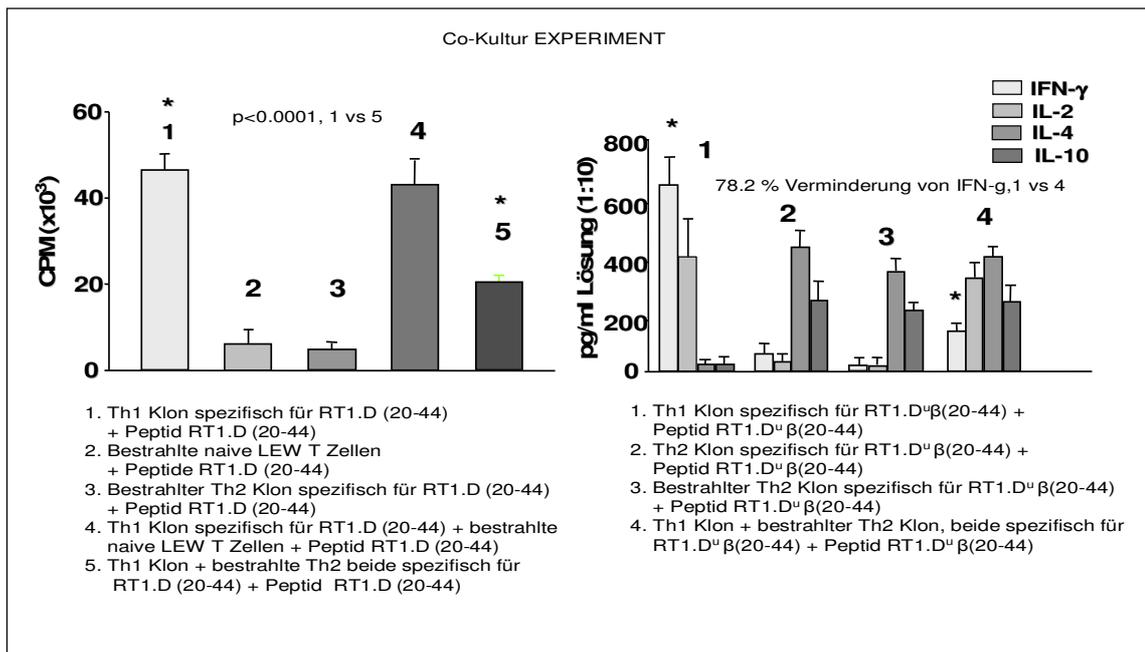


Abb.4.2: In vitro Zellproliferation auf das immunogene Peptid RT1.D (20-44) (links) und entsprechende Zytokinexpression (rechts). Die Addition von bestrahltem Th2-Klon reduzierte signifikant die Reaktivität des Th1-Zell-Klons ($p < 0.0001$), jedoch zeigte sich keine signifikante Veränderung der Reaktivität mit bestrahlten Th2-Zellen. Th1-Zell-Klon unter Zugabe von bestrahltem Th2-Zell-Klon zeigte eine reduzierte Produktion von IFN- γ .

4.3. Überprüfung der regulatorischen Funktion der Th2-Zell-Klone in vivo

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Fähigkeit der Übertragbarkeit einer alloantigen-spezifischen Immunantwort in vivo durch jeweils etablierte TCRV β 9 exprimierende T-Zell-Klone aus dem toleranten Tier sowie jenem mit Abstoßung untersucht.

Naiven LEW-Tieren wurde dazu der T-Zell-Klon intraperitoneal injiziert. Nach fünf Tagen wurde diesen Tieren entweder RT1.D^u β (20-44) Peptid oder bestrahlte spenderspezifische (WF) Milzzellen subkutan verabreicht und anschließend nach 48 Stunden die DTH Antwort bestimmt. Übereinstimmend mit den in Abb. 4.2 beschriebenen Ergebnissen in vitro zeigte sich nach Übertragung des TCR V β 9 exprimierenden Th1-Zell-Klons aus dem abstoßenden Tier eine signifikante DTH Antwort ($1,35 \pm 0,3$ (Peptid) versus $1,45 \pm 0,16 \times 10^{-2}$ inches (Milzzellen)).

Dieses fand sich nicht nach intraperitonealer Übertragung des TCR V β 9 exprimierenden Th2-Zell-Klons aus dem toleranten Tier ($0,45 \pm 0,2$ (Peptid) versus $0,48 \pm 0,2 \times 10^{-2}$ inches (Milzzellen)) oder nach Übertragung von bestrahlten naiven LEW T-Zellen $0,48 \pm 0,2$ (Peptid) versus $0,48 \pm 0,2 \times 10^{-2}$ inches (Milzzellen)). Die simultane intraperitoneale Gabe von Th1- plus bestrahlten Th2-Zell-Klon ergab $0,18 \pm 0,1$ (Peptid) versus $0,03 \pm 0,05 \times 10^{-2}$ inches (Milzzellen). Die Ergebnisse der

Gabe von Th1- Zell-Klon plus bestrahlten naiven LEW T-Zellen waren vergleichbar mit denen nach Gabe des Th1-Zell-Klons (Abb.4.3).

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass das Ausbleiben einer DTH Antwort auf eine Unfähigkeit der Th2-Zellen zurückzuführen war, in vivo zu expandieren oder zum Standort des Antigens (Ohren) zu migrieren, wurde zusätzlich in weiteren Tieren eine Mischung von Th-Klonen (Th1-Klon mit bestrahltem Th2-Zell-Klon, dem RT1.D^uβ(20-44) Peptid und bestrahlten APCs) lokal intradermal in die Ohren injiziert. Als Kontrolle wurde jeder Klon für sich allein intradermal injiziert. Dieses ergab übereinstimmende Ergebnisse wie nach intraperitonealer Applikation der Th-Klone ($0,1 \times 10^{-2}$, n=8 für Th1 plus Th2; $0,45 \pm 0,054 \times 10^{-2}$ inches, n=8 für Th1 allein versus 0, n=8 für Th2 allein; Daten graphisch nicht dargestellt). Diese Ergebnisse geben ein Hinweis darauf, dass die alloreaktiven Th2-Zell-Klone keine antigenspezifische DTH-Antwort in vivo induzieren.

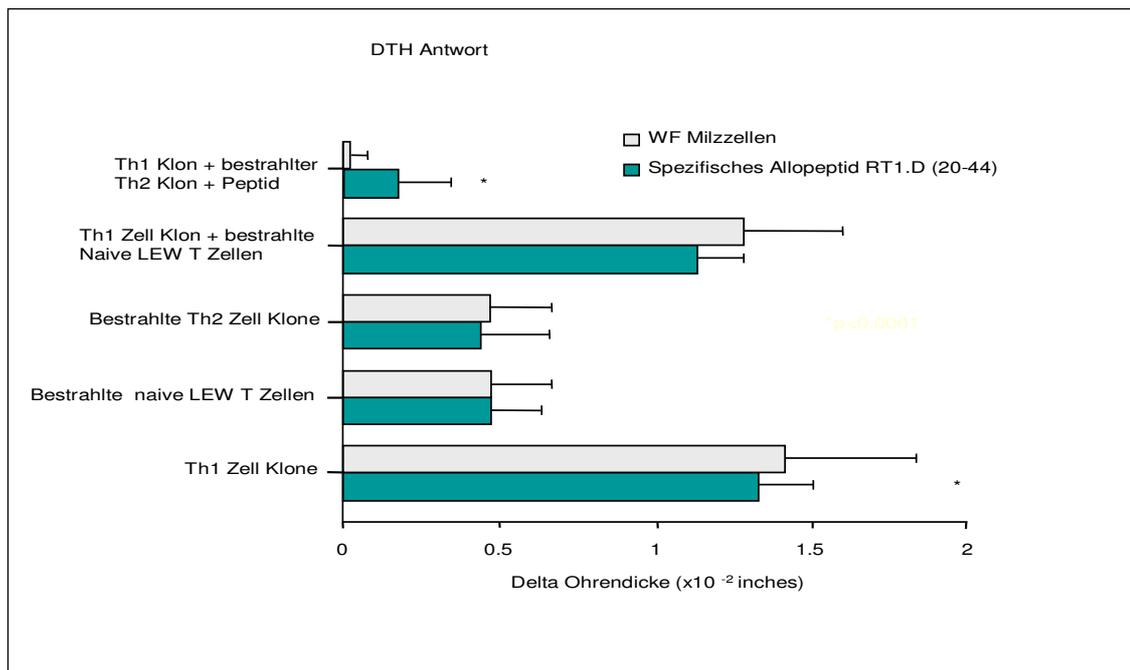


Abb.4.3: In vivo Reaktion der T-Zell-Klone. Eine identische DTH-Antwort, sowohl gegen das spezifische Peptid als auch gegen die verabreichten bestrahlten Spender-Milzzellen, zeigten behandelte Tiere, die mit bestrahltem Th2-Zell-Klon oder mit bestrahlten naiven LEW-T Milzzellen intraperitoneal behandelt wurden. Intraperitoneal mit Th1-Zell-Klon behandelte Tiere wiesen eine signifikante DTH-Antwort auf. Die Ergebnisse wurden als Δ Ohrstärke vor und nach dem Eingriff errechnet ($\times 10^{-2}$ inches).

4.4. Charakterisierung der Th1- und Th2- induzierten Effekte nach Transplantation

4.4.1. Überlebensdaten nach Nierentransplantation

Tiere der syngenen Kontrolle (LEW->LEW, Gruppe 1) überlebten länger als 250 Tage, die Tiere der allogenen Gruppe hingegen (Gruppe 2) starben nach $6,3 \pm 0,8$ Tagen. Tiere mit Th1-Zell-Klon-Transfer (30×10^6 Zellen/Tiere) aus einem akut abstoßenden Tier stießen ihre Transplantate beschleunigt ab ($4,6 \pm 0,8$ Tage, Gruppe 3). Aus einem alleinigen Th2-Zell-Klon-Transfer ergab sich eine Überlebensdauer von $10,5 \pm 1,1$ Tagen (Gruppe 4). Tiere, die Th1-Zell-Klon und bestrahlten Th2-Zell-Klon (30×10^6) erhielten, überlebten nicht länger als $7,9 \pm 2,4$ Tage (Gruppe 5). Unter alleiniger CsA-Therapie überlebten die Tiere $121,7 \pm 34,6$ (Gruppe 6). Zur Untersuchung der Wirkung der Th1-und/oder Th2-Zell-Klone erhielten die Tiere der Gruppen 7-9 nach der Nierentransplantation (eine niedrige CsA-Gabe) Th1-, Th2- oder Th1 + Th2-Zell-Klone (30×10^6 , intraperitoneal). Wurden Tieren unter CsA-Behandlung Th1-Zell-Klone hinzugefügt, starben diese bereits nach $65 \pm 20,4$ Tagen (Gruppe 7). Tiere mit einem Th2-Zell-Klon-Transfer und CsA-Therapie, etabliert aus toleranten Tieren, überlebten mehr als 250 Tage (Gruppe 8). Unter Th1- und bestrahltem Th2-Zell-Klon-Transfer dagegen überlebten die Tiere $221 \pm 35,4$ Tage (Gruppe 9) (Tab. 4.4.1). Die Th1 und Th2 Zell-Klone wurden mit ihrem jeweiligen Peptid sowie T-Stim Kultursupplement human ohne PHA vergleichbar kultiviert. Die Th2 Klone wuchsen im Unterschied zu Th1 Klonen deutlich langsamer, durch repetitive Stimulation liessen sie sich jedoch auf die benötigte Anzahl von 30×10^6 Zellen pro Tier expandieren. Der Adoptivtransfer dieser Klone erfolgte jeweils in der nach Stimulation folgenden Ruhephase dieser Zellen. Die Daten zeigen, dass die Th2-Klone in der Lage waren, die Auswirkungen der Th1-Klone (Beschleunigung der Allotransplantatabstoßung) umzukehren.

Tab.4.4.1: Überlebensdaten der Tiere

GRUPPEN	STAMMKOMBINATIONEN (N=8/GRUPPE)	THERAPIE	ÜBERLEBEN (TAGE)
1	LEW->LEW	keine	>250
2	WF->LEW	keine	6,3 ± 0,8
3	WF->LEW	Th1-Zell-Klon (30x10 ⁶)	4,6 ± 0,8
4	WF->LEW	Th2-Zell-Klon (30x10 ⁶)	10,5 ± 1,1
5	WF->LEW	Th1+ Th2-Zell-Klon (30x10 ⁶)	7,9 ± 2,4
6	WF->LEW	CsA, 1mg/kg Tag 0-3 und 5mg/kg Tag 4-7, s.c.	121,7 ± 34,6
7	WF->LEW	Th1-Zell-Klon (30x10 ⁶) + CsA, 1mg/kg Tag 0-3 und 5mg/kg Tag 4-7, s.c.	65,0 ± 20,4
8	WF->LEW	Th2-Zell-Klon (30x10 ⁶) + CsA, 1mg/kg Tag 0-3 und 5mg/kg Tag 4-7, s.c.	>250
9	WF->LEW	Th1- + Th2-Zell-Klon (30x10 ⁶) + CsA, 1mg/kg Tag 0-3 und 5mg/kg Tag 4-7, s.c.	221,0 ± 35,4

WF, Wister-Furth Rattenstamm; LEW, Lewis Rattenstamm; CsA, Cyclosporin; s.c., subcutan.

4.4.2. Überlebensdaten nach Hauttransplantation (Toleranz)

Langfristig überlebende Tiere unter CsA-Therapie und Th2-Zell-Klon Transfer akzeptierten sekundäre spenderspezifische Hauttransplantate (>60 Tage, n=6), während der dritte Stamm (ACI) abgestoßen wurde (7,5±1,5 Tage). Die Spezifität der Funktion der Th2-Zellen bei der Regulierung der alloimmunen Reaktion wurde somit in vivo bestätigt. Die syngenen (LEW) Hauttransplantate wurden ohne Anzeichen einer Abstoßung akzeptiert (Tab.4.4.2).

Tab.4.4.2: Th2-Zell-Klon induzierte Toleranz gemessen an der Akzeptanz von Spenderhaut

GRUPPEN	ÜBERLEBEN (TAGE)	HAUTTRANSPLANTATABSTOßUNG (TAGE)		
		syn	allo	Drittstamm (ACI)
Th2-Zell-Klone + CsA	>250 (n=6/6)	>60	>60	7,5±1,5
Th1- + Th2-Zell-Klone + CsA	>250 (n=3/6)	>60	>60	7,1±1,4

4.4.3. Ergebnisse der Nierenfunktion nach Nierentransplantation

Die Eiweißausscheidung im Harn ist eine empfindliche Messung für chronische Allotransplantatdysfunktion bei Ratten (35, 54). Daher wurden bei den Tieren 24 stündlich Eiweißausscheidungen in Intervallen von 4 Wochen gemessen. Die syngenen Transplantatempfänger wiesen eine Eiweißausscheidung von <20mg/24 Std. auf. Kontrolltiere, die nur mit CsA behandelt wurden, entwickelten eine zunehmende Proteinurie und verzeichneten damit eine chronische Allotransplantatdysfunktion. Die mit Th1-Zell-Klon injizierten Tiere entwickelten schnell eine Proteinurie, die bedeutend höher war als bei den CsA-behandelten Tieren. Wurden die Tiere mit Th2-Zell-Klon injiziert und mit dem kurzfristigen CsA-Protokoll behandelt, blieb die Eiweißausscheidung auf der Basis der syngenen Kontrolle. Tiere unter Th1- und Th2-Zell-Klon Transfer und mit CsA Behandlung entwickelten langsam eine fortschreitende Proteinurie. Mit CsA und Th2-Zell-Klon behandelte Tiere blieben mit der syngenen Kontrolle vergleichbar. Die Daten der Proteinurie (Abb. 4.4.3) stimmen mit den oben aufgeführten Überlebensdaten des Transplantats überein und zeigen an, dass Th1-Zell-Klon zu einer Progression der chronischen Allotransplantatnephropathie führt, während Th2-Zell-Klon die Regulierung der alloimmunen Reaktion unterstützt. Diese stellen somit einen protektiven Effekt im Zuge der progressiven chronischen Abstoßung dar. Die histologische Darstellung der chronischen Abstoßung ist in Abb.4.4.6.1 veranschaulicht.

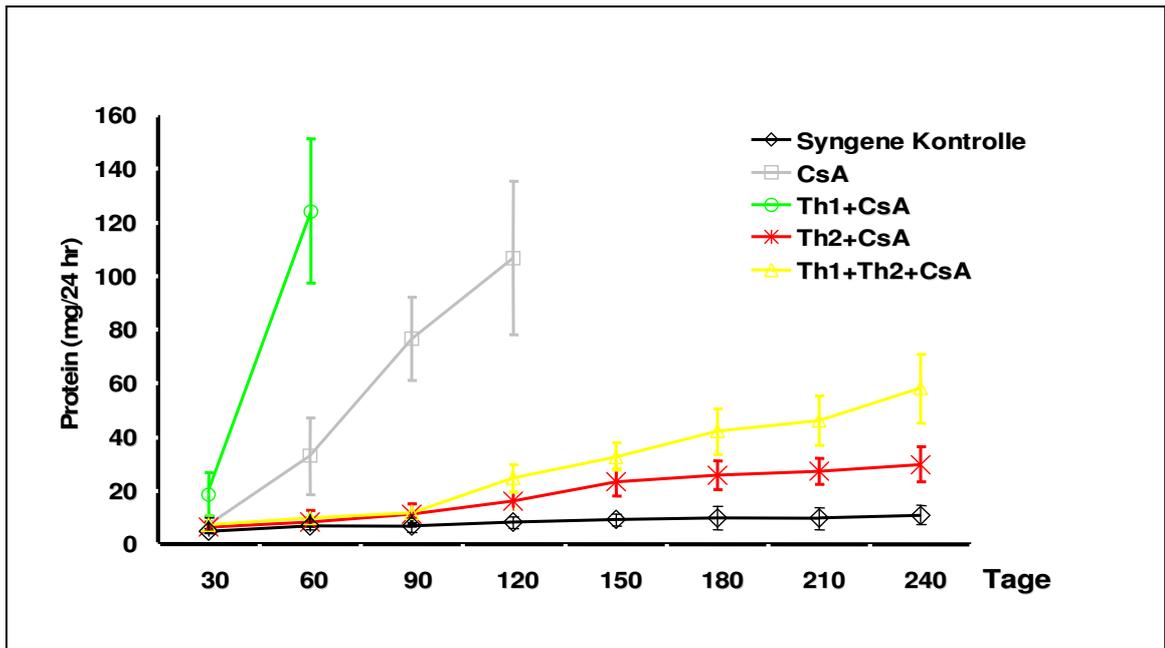


Abb.4.4.3: Tiere mit Th1-Zell-Klon Transfer und temporärer CsA-Behandlung entwickelten beschleunigt eine progressive Proteinurie. Mit Th2-Zell-Klon + CsA behandelte Tiere blieben mit der syngene Kontrolle vergleichbar.

4.4.4. Ergebnisse des Zytokinprofils (ELISPOT)

Milzzellen der untersuchten Tiere wurden gewonnen und im ELISPOT bezüglich der Frequenz und des Phänotyps in Reaktion auf die Spenderzellen *in vitro* analysiert. Wie aus Abbildung 4.4.4 ersichtlich, wiesen die mit CsA behandelten Kontrolltiere und die mit Th1-Klon eine signifikante IFN- γ Expression (charakteristisches Th1-Zytokinprofil) auf, jedoch keine signifikante IL-10-Sekretion (Th2-Zytokinprofil). Im Gegensatz dazu zeigten die Milzzellen der Th2-Klon behandelten Tiere eine signifikante alloreaktive T-Zellantwort, dominiert von einem IL-10 Zytokinprofil. Die mit Th1- und Th2-Zell-Klon behandelten Tieren zeigten eine IFN- γ - und IL-10-Expression auf, wobei letztere prodominant erschien.

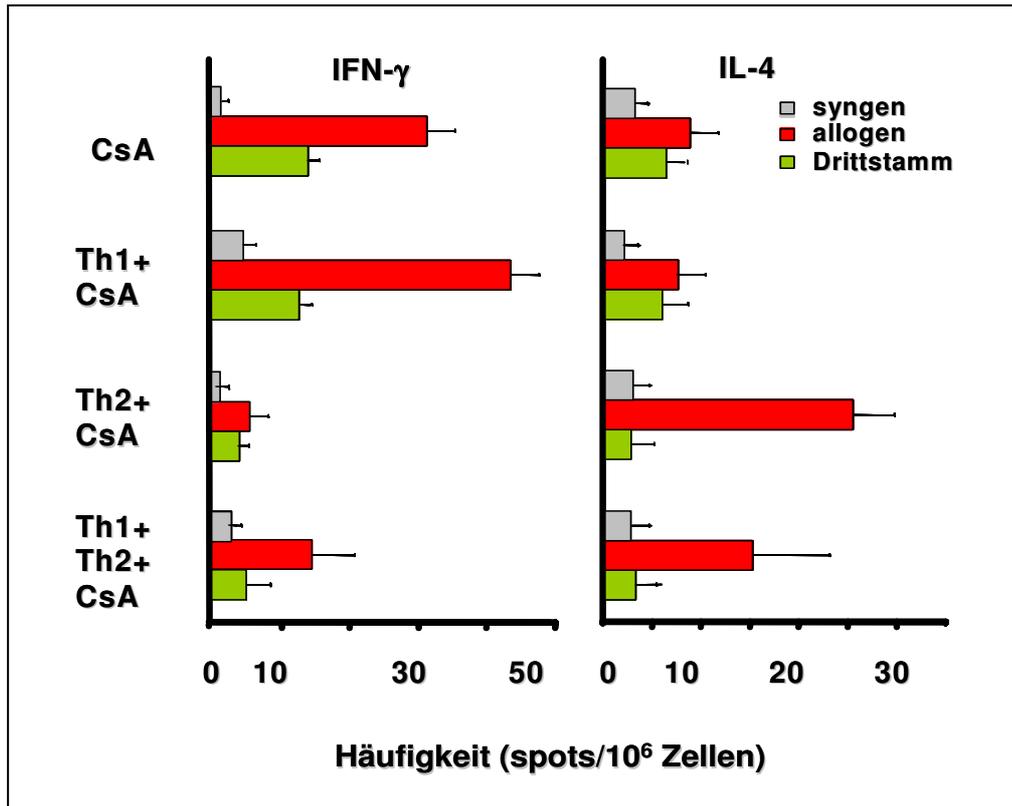


Abb.4.4.4: ELISPOT-Analyse aus Milzzellen, getestet gegen Spenderzellen in vitro. CsA oder Th1-Zell-Klon plus CsA behandelte Tiere zeigten eine signifikante Expression von IFN- γ . Im Gegensatz dazu exprimierten die Tiere mit Th2-Zell-Klon plus CsA IL-10. Tiere, behandelt mit beiden T-Zell-Klonen plus CsA, wiesen eine IFN- γ und IL-10-Expression auf. Die Häufigkeit wurde in spots/10⁶ Zellen dargestellt.

4.4.5. Zytokin-Genexpressionsergebnisse (RNase Protectionassay) und Real time PCR)

Die syngene Kontrolle ist nur durch ein geringes Maß an IL-1 β gekennzeichnet. Tiere, die nur einer CsA-Therapie unterlagen, exprimierten ein hohes Maß an inflammatorischen Zytokin-Genen: IL-1 β , IL-6, TNF- α und IFN- γ . Eine noch höhere Expression dieser Gene, mit Ausnahme von TNF- α , wiesen Tiere auf, die neben CsA Th1-Zell-Klon bekamen. Nieren aus Th2-Zell-Klon + CsA behandelten Tieren exprimierten vor allem IL-10 und geringe Mengen an IL-1 β . Bei simultanem Einsatz von Th1+Th2-Zell-Klon und CsA fand sich ebenfalls eine hohe IL-10 Expression wobei nur geringe Mengen an IL-1 β , IL-6, TNF- α detektiert wurden (Abb.4.4.5.1).

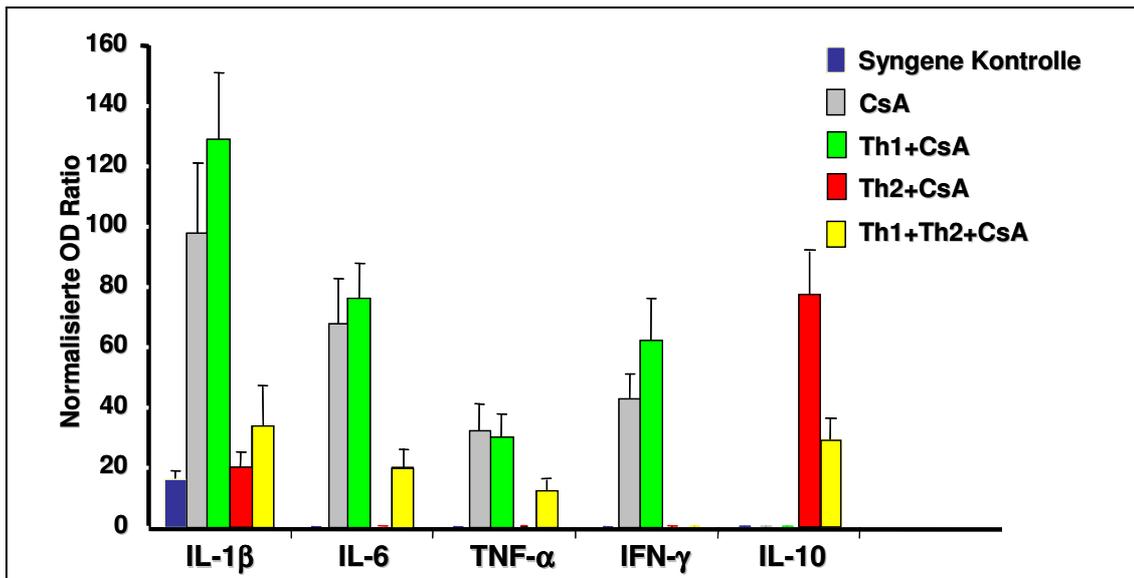


Abb.4.4.5.1: Zytokin-Genexpression von Nieren-Allotransplantaten - RNase Protection Assay: Die syngene Kontrolle: nur ein geringes Maß an IL-1 β war ersichtlich. Tiere unter CsA-Therapie exprimierten IL-1 β , IL-6, TNF- α und IFN- γ . Eine noch höhere Expression dieser Gene wiesen Tiere auf, die neben CsA auch noch Th1-Zell-Klon bekamen. Nieren aus Th2-Zell-Klon + CsA und Th1+Th2-Zell-Klon und CsA behandelten Tieren exprimierten v.a. IL-10. Letztere exprimierten geringe Mengen an IL-1 β , IL-6, TNF- α . Die Normalisierung der OD ratio wurde durch eine Imagequant Software errechnet. Error bars show mean \pm SEM.

Abb.4.4.5.2 veranschaulicht die mRNA Expression repräsentativer inflammatorischer und für die chronische Abstoßung verantwortlicher Mediatoren nach allogener Nieren-Allotransplantation. Nieren aus CsA- und Th1-Zell-Klon + CsA behandelten Tieren exprimierten eine signifikante Menge an IL-1 β , MCP-1 und TNF- α . Nieren aus Th2-Zell-Klon + CsA behandelten Tieren unterschieden sich nicht signifikant von der syngenen Kontrolle. Eine signifikante Menge an TGF- β war bei diesen Gruppen ersichtlich. Behandelte Tiere mit Th1- und Th2-Zell-Klon waren durch eine große Menge an TGF- β gekennzeichnet und zeigten nur eine geringe Expression an inflammatorischen Mediatoren (IL-1 β , MCP-1 und TNF- α) (Abb.4.4.5.2). Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse einen Hinweis auf regulatorische Funktionen des Th2-Zell-Klons, da die Transplantate dieser Gruppe eine höhere Expression an IL-10 und TGF- β aufwiesen.

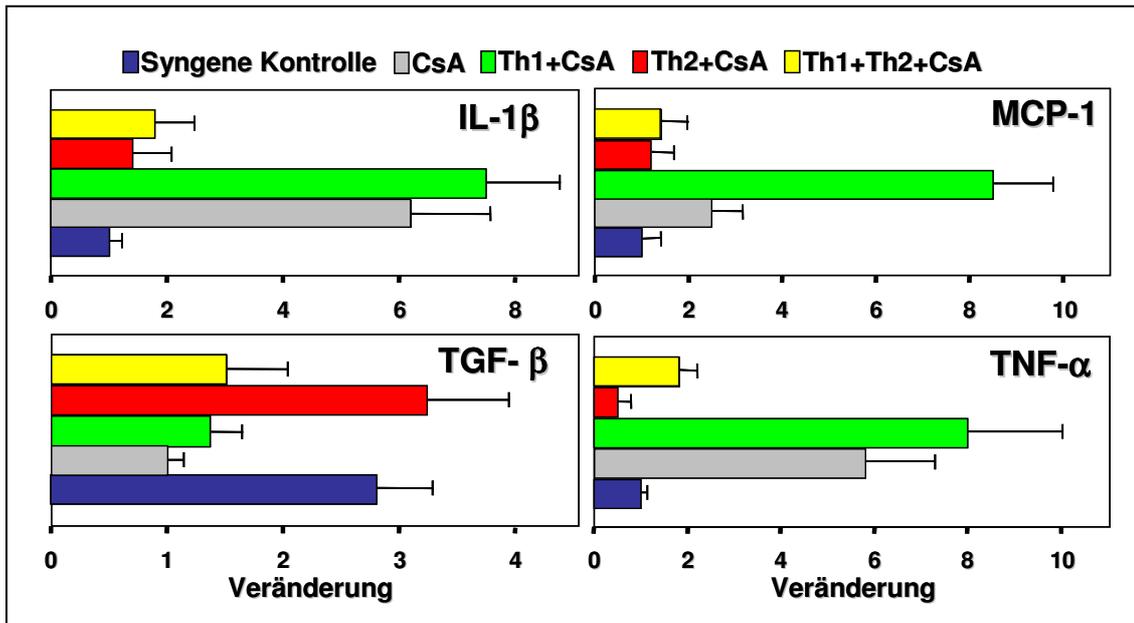


Abb.4.4.5.2: mRNA Expression repräsentativer inflammatorischer und für die chronische Abstoßung verantwortlicher Mediatoren nach allogener Nieren-Allotransplantation: Nieren aus CsA- und Th1-Zell-Klon + CsA behandelten Tieren: signifikante Expression von IL-1 β , MCP-1, TGF- β und TNF- α . Nieren aus Th2-Zell-Klon + CsA behandelten Tieren: kein signifikanter Unterschied zur syngenen Kontrolle. Veränderung (Fold difference = $2^{-\Delta\Delta CT}$ Zell)

4.4.6. Histologische und Immunhistologische Analyse

4.4.6.1. Histologische Untersuchungen (Morphologie)

Um die morphologischen Veränderungen bei Tieren mit chronisch abgestoßen Nieren festzustellen, wurden histologische Untersuchungen (Morphologie) durchgeführt. Tiere der syngenen Kontrolle zeigten keine Veränderung (Abb.4.4.6.1:(A)). Unter CsA-Therapie dagegen waren progressive Veränderungen einer chronischen Abstoßung (CAN) ersichtlich (Abb.4.4.6.1(B)). Nach Zugabe von Th1-Zell-Klon war eine deutliche Zellinfiltration mit intensivierten chronischen Veränderungen erkennbar (Abb.4.4.6.1:(C)). Keine Anzeichen einer chronischen Abstoßung wurde bei Tieren mit Th2-Zell-Klon-Behandlung festgestellt (Abb.4.4.6.1:(D)). Tiere, die nicht länger als 250 Tage überlebten (Th1 + Th2-Zell-Klon), zeigten Anzeichen einer chronischen Abstoßung (Abb.4.4.6.1:(E)); die Hälfte der Tiere aus dieser Gruppe überlebte länger als 250 Tage ohne histomorphologische Anzeichen einer chronischen Abstoßung (Abb.4.4.6.1:(F)). Diese Ergebnisse stehen im engen Zusammenhang mit den Überlebensdaten der Tiere (Tab.4.4.1).

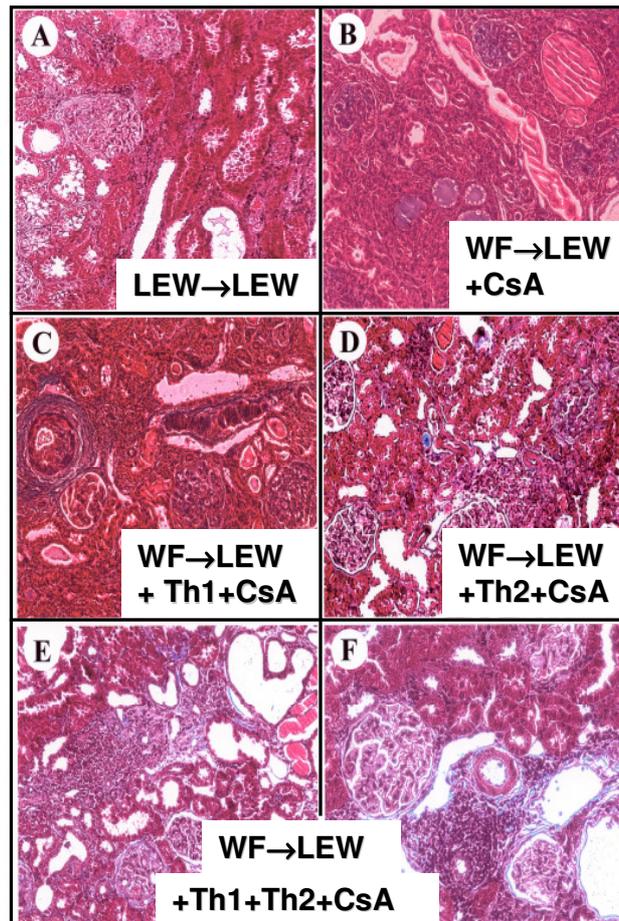


Abb.4.4.6.1: Histomorphologische Darstellung der explantierten Nieren: (A) (syngene Kontrolle) zeigt keine Veränderung, (B) repräsentiert eine chronische Abstoßung (progressive Veränderungen), (C) beschreibt eine deutliche Zellinfiltration mit intensivierten chronischen Veränderungen - vgl. mit (B). (D), keine Anzeichen einer chronischen Abstoßung, vergleichbar mit (A). (E) und (F): Tiere, die nicht länger als 250 Tage überlebten: Anzeichen einer chronischen Abstoßung (links unten); Tiere die länger als 250 Tag überlebten, keine Anzeichen einer chronischen Abstoßung (rechts unten).

4.4.6.2. Zytokinprofil bei Tieren mit chronischer Transplantatabstoßung und bei toleranten Empfängern

Die immunhistologischen Ergebnisse der Nieren aus Th1-Zell-Klon und Th2-Zell-Klon behandelten Tieren zeigten vergleichsweise identische Akkumulationen an mononukleären Zellen und CD4+ T-Zellen. In Gefrierschnitten aus beiden Präparaten war nur eine geringe Zahl an CD8+ T-Zellen erkennbar. Der Th1-Zell-Klon Transfer ging mit einer hohen Beteiligung des inflammatorischen Zytokins IFN- γ einher. Bei Tieren, die einem Th2-Zell-Klon Transfer unterlagen, war dieser inflammatorische Prozess nicht detektierbar jedoch ein deutlicher IL-10 Nachweis. Weiterhin war eine deutliche Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 und des Th2-Zell-Markers T1/ST2 ersichtlich, welche unter Th1-Zell-Klon-Transfer nicht nachgewiesen wurden (Abb.4.4.6.2). Die vorliegenden Er-

gebnisse bestätigen das detektierte Zytokin-Gen-Profil, welches in den Organen der Tiere mit Th1- bzw. Th2-Zell-Klon Transfer durch RNase Protection Assay gefunden wurde (Abb.4.4.5.1). Der Nachweis von GATA-3 und T1/ST2 geben einen Hinweis auf das Vorhandensein regulatorischer Zellen in diesem Transplantat.

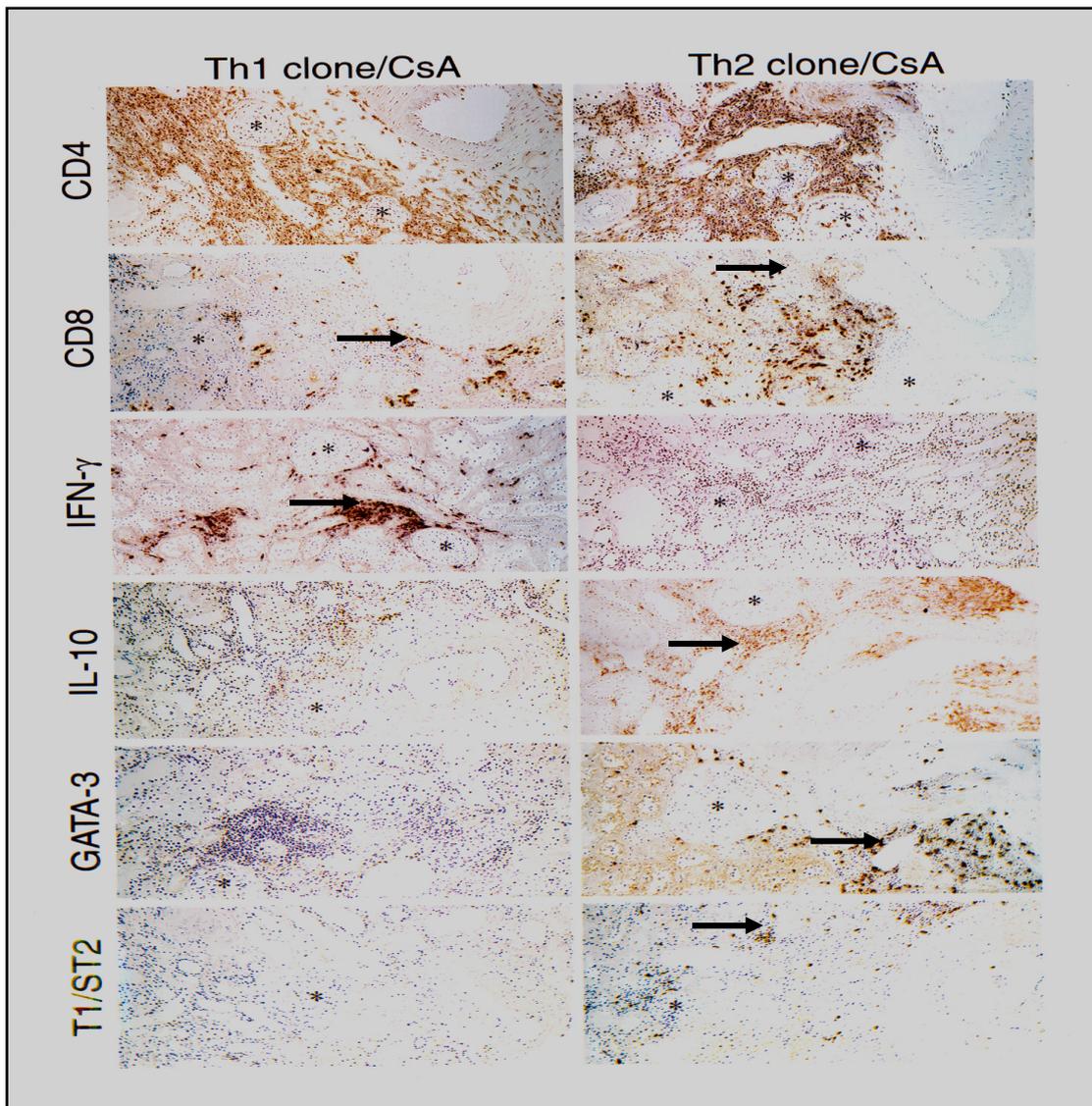


Abb.4.4.6.2: Nieren aus Th1- oder Th2-Zell-Klon + CsA behandelten Tieren: Vergleichbare mononukleäre Zellinfiltrate, CD4+ Zellen und geringe Anzahl CD8+ Zellen. Th1-Transfer war mit einem Nachweis von IFN- γ verbunden. Th2-Transfer wurde von einem deutlichen IL-10 Nachweis, einer deutlichen Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 und des Th2-Markers T1/ST2 begleitet.

4.4.7. Ergebnisse und Histologie der Doppelmarkierung

Um in der Doppelfärbung auch das Ausmaß der Gesamtreaktion beurteilen zu können, wurde das Schema für die Kriterien der Einzelfärbungen (Tab.4.4.7.1) zur Beurteilung der sich singulär (selektiv) in der Doppelfärbung darstellenden HRP- und AP- markierten AK angewandt. Den Kriterien der Doppelmarkierung (Tab. 4.4.7.1) liegt das Ausmaß des Nachweises zweier Antigene auf einer Zelle (HRP- und AP- Markierung) zugrunde. Zur Beurteilung der immunenzymatischen Einzel- und Doppelfärbungen gibt die Tabelle 4.4.7.2 einen Überblick. Die relevanten Ergebnisse sind darin rot dargestellt und werden im Folgenden erläutert.

Tab.: 4.4.7.1. Beurteilung der immunenzymatischen (a) Einzel- und (b) Doppelfärbungen.

<i>a) für Einzelfärbung</i>		b) Doppelmarkierung	
(+)	$x < 10\%$	(+)	selten
+	10%-20%	+	mild
++	20%-40%	++	moderat
+++	40%-60%	+++	stark
++++	60%-80%	*	ubiquitär
+++++	80%-100%		
„()“	<i>Unteres Viertel des Prozentbereiches</i>		

Beurteilung der sich singulär (selektiv) in der Doppelfärbung darstellenden HRP- und AP- markierten AK (a) und der Doppelmarkierung (b).

Tab.:4.4.7.2: Ergebnisse der Einzelfärbung (unten) und Doppelfärbungen (oben).

Doppelfärbung	LEW->LEW	LEW->WF+CSA+ Th2	LEW->WF+CSA+Th1	LEW->WF+CSA
TCR/class II MHC	+	++	+++*	+++*
	++/+++(+)	++/+++	+++/(+)	+++/(+)
CD 4/ED 1	(+)	(+)	+++	+
	+++/(+)	++++/(+)	++++/(+)	++++/(+)
CD 8/ED 1	+	+	(+)	(+)
	++/++	+(+)/+++	+/(+)	+(+)/+(+)
CD 4/CD 25	+	+/++	-/(+)	(+)
	++/+(+)	+(+)/+++	+(+)/+++(+)	+/(+)
CD 4/CD 45 RC	(+)	(+)	++*	+
	+(+)/+(+)	+++/(+)	++++/(+)	+++/(+)
CD 8/CD 45 RC	(+)	(+)	+	(+)
	++/+	++/+	+++/+	+(+)/+(+)
CD 4/CD 45 RA	++	+	++	-
	+++/(+)	++++/(+)	++++/(+)	+++/(+)
CD 8/CD 45 RA	(+)	(+)	+	-
	+(+)/+++	+(+)/+	+(+)/+(+)	++/(+)
CD 4/CTLA-4	(+)	+	(+)	-/(+)
	+/+	+++/(+)	++++/(+)	++++/(+)
CD 8/CTLA-4	-	(+)	-/(+)	-/(+)
	+/(+)	++/(+)	+(+)/+++(+)	++/+++
B7.1/CD 28	-	-/(+)	(+)*	(+)*
	(+)/+(+)	-/(+)	(+)/+(+)	(+)/++
B7.2/CD 28	-	(+)	+(+)*	+
	(+)/+(+)	(+)/+++	+/(+)	(+)/+++
B7.1/CTLA-4	-	(+)/+	(+)	-
	(+)/+(+)	(+)/+++	-/(+)	(+)/+++
B7.2/CTLA-4	-	+	(+)	-
	(+)/+++	++/+++	+/(+)	+/-
B7.1/ED 1	-	-	-/(+)	-/(+)
	-/(+)	(+)/+++	(+)/++++	+/(+)
B7.2/ED 1	-/(+)	-/(+)	+	(+)
	(+)/+++(+)	(+)/+++	+/(+)	+(+)/+++
Fas-L/Fas	-/(+)	-	(+)	-
	(+)/+++(+)	(+)/+	(+)/+++(+)	-/+

Der jeweils zuerst genannte Antikörper der Doppelfärbungskombination ist mit HRP (bräunlicher Farbton), der zweit genannte mit AP (roter Farbton) konjugiert. Das Ergebnis oberhalb der Klammer gibt Auskunft über das Ausmaß der Doppelmarkierung. Das Ergebnis unterhalb gibt die Intensität der jeweiligen Einzelfärbungen in der Doppelmarkierung wieder, die mit einem Querbalken (/) voneinander abgegrenzt sind. AP, alkalische Phosphatase; APC, Antigen präsentierenden Zelle; CD, Differenzierungscluster; HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4) ; CsA, Cyclosporin A; MHC, Major Histokompatibilität Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex); TCR, T-cell-receptor (T-Zellenzeptor); * ubiquitär (teilweise Nebenreaktion mit anderen Gewebesstrukturen).

CD4+ T-Zellen und Makrophagen

Eine mögliche Beteiligung von Makrophagen (ED1) und CD4-T-Helferzellen wurden analysiert, um inflammatorische Prozesse als Ursache der chronischen Transplantatabstoßung zu untersuchen. Tiere unter Th1-Zell-Klon Behandlung wiesen eine deutliche Anzahl dieser Zellpopulationen auf, wohingegen bei Tieren der syngenen Kontrolle, bzw. Th2-Zell-Klon Behandlung, eine geringe Beteiligung detektiert wurde (Tab.:4.4.7.2).

CD4+CD25+ und CD4+CD45RC+ T-Zellen

Um den Aktivierungszustand der T-Helferzellen näher zu analysieren, wurde eine Doppelfärbung von CD4 in Verbindung mit CD25 und CD45RC durchgeführt. Sowohl CD25 als auch CD45RC sind Marker der T-Zell-Aktivierung, wobei CD25 mit regulatorischen T-Zellen assoziiert wird. Es zeigte sich eine nahezu identische Expression von CD4+CD25+ T-Zellen bei Tieren mit Th2-Zell-Klon Behandlung und der syngenen Kontrolle; diese Expression wurde bei der beschleunigten chronischen Abstoßung (Th1-Zell-Klon Behandlung) und CsA-Therapie nicht beobachtet (Tab.:4.4.7.2).

CD4+CD45 RC+ Lymphozyten fanden bei Th1-Zell-Klon Behandlung und CsA-Therapie beachtliche Relevanz (Tab.:4.4.7.2). Tiere, die eine Langzeittoleranz aufwiesen (Th2-Zell-Klon Behandlung), und der syngenen Kontrolle (LEW->LEW) zeigten keine erhöhte Expression dieser Zellen (Tab.:4.4.7.2).

CD4+CTLA-4+ T-Zellen

Um die T-Zellen näher auf einen möglichen regulatorischen Phänotyp zu untersuchen, wurde der CTLA-4 Marker in Kombination mit CD4 in einer Doppelmarmarkierung veranschaulicht. Die Ergebnisse bei Langzeittoleranz (Th2-Zell-Klon Behandlung) geben einen Hinweis auf das Vorhandensein dieses Zelltyps und legen die Vermutung der Existenz regulatorischer T-Zellen bei Langzeitorganakzeptanz nahe, verglichen mit Tieren der syngenen Kontrolle (LEW->LEW). Jedoch wurde keine deutliche Expression des CD4+CTLA-4+ T-Zellen in Tieren mit beschleunigter chronischer Abstoßung (Th1-Zell-Klon) sowie bei Tieren unter CsA-Therapie beobachtet (Tab.:4.4.7.2).

B7-1/ CD28 oder CTLA-4 und B7-2/CD28 oder CTLA-4

Sowohl B7-1 als auch B7-2 sind in der Lage, das CD28- und CTLA-4-Oberflächenmolekül zu binden. CD28 scheint eine Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen zu spielen, während CTLA-4 vermutlich eine Funktion als inhibitorischer Rezeptor für die Herunterregulierung der Immunantwort besitzt. Darüber hinaus beeinflusst CD28 möglicherweise auch die Differenzierung von Th-Zellen. CTLA-4 soll zudem eine Rolle bei der T-Zelltoleranz spielen. Die Doppelfärbung mit einem anti-B7-1- oder -B7-2- und einem anti-CD28-Antikörper zeigte bei Tieren mit beschleunigter chronischer Transplantatabstoßung (Th1-Zell-Klon Behandlung) eine erhöhte Expression. Bei individueller Betrachtung der B7-1 und B7-2 Moleküle war folgender Unterschied feststellbar: Während B7-1/CD28 schwach nachweisbar war (Tab.:4.4.7.2), fand sich für B7-2/CD28 eine deutliche Expression. In nicht behandelten (LEW->LEW), und langzeittoleranten Tieren (Th2-Zell-Klon-Behandlung), war diese Expression wesentlich geringer ausgeprägt (Tab. 4.4.7.2). Dagegen fand sich eine erhöhte Expression von B7-2/CTLA-4 bei Langzeitorganakzeptanz (Th2-Zell-Klon Behandlung) und bei Kontrolltieren (LEW->LEW). Tiere mit beschleunigter chronischer Abstoßung (Th1-Zell-Klon Behandlung) und CsA-Behandlung wiesen dagegen nur eine geringe Expression auf (Tab.:4.4.7.2).

4.4.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Diese Ergebnisse zeigen, dass Tiere, die ihr Transplantat abstießen, vom Th1-Zell-Phänotyp (IFN- γ) bestimmt waren, während langzeittolerante Tiere mit einem Th-2-Zell-Typ assoziiert waren (IL-10). In vivo wurde eine signifikante DTH Antwort nach Th1-Zell-Klon Behandlung gezeigt, wohingegen Tiere mit Th2-Zell-Klon Behandlung diese nicht aufwiesen. Weiterhin wurde eine Herunterregulation der Th1-Zell-Klon Antwort durch die Th2 Immunantwort (in vitro und in vivo, DTH-Antwort) festgestellt. Die regulatorischen Funktionen der Th2-Zell-Klone wurden in einem experimentellen allogenen Nierentransplantationsmodell nachgewiesen.

Transplantatüberleben und –funktion: Die Proteinuriewerte bestätigen die Überlebensdaten der Tiere und weisen auf beschleunigte chronische Abstoßung

nach Th1-Zell-Klon Behandlung hin, wohingegen Th2-Zell-Klon Behandlung diese verhindern konnte.

Transplantatmorphologie: Alle Empfängernieren mit Th2-Zell-Klon Behandlung waren morphologisch mit den Nieren syngener Tieren vergleichbar. Es zeigte sich keine erhöhte mesangiale Matrixbildung oder intestinale Fibrosierung und nur milde chronische Veränderungen der mittleren Gefäße im Bereich der kortikomedullären Verbindungen. Interessanterweise zeigten diese Transplantate ein mildes interstitielles Infiltrat im Bereich des Kortex und des kortikomedullären Übergangs. Zeichen einer verstärkten chronischen Abstoßung waren bei Tieren mit Th1-Zell-Klon Behandlung zu beobachten.

Immunhistochemische Färbung: Zusätzlich wurde unter Th2-Zell-Klon Transfer, jedoch nicht unter Th1-Zell-Klon Transfer, eine im Transplantat positive Färbung für spezifisch regulatorische Zellmarker GATA-3 und den Th2 Marker T1/ST2 gezeigt. Diese Daten definieren die im Transplantat vorkommenden Zellen, welche mit Th2-Zell-Klon Transfer einhergingen.

Doppelfärbung:

CD4+ T-Zellen und Makrophagen

Die Anzahl an Makrophagen (ED1) und CD4-T-Helferzellen wurde analysiert, um inflammatorische Prozesse als Ursache der chronischen Transplantatabstoßung zu untersuchen. Tiere unter Th1-Zell-Klon Behandlung wiesen eine deutliche Anzahl dieser Zellen auf, wohingegen bei Tieren der syngenen Kontrolle, bzw. Th2-Zell-Klon Behandlung, eine geringe Beteiligung detektiert wurde.

CD4+CD25+ und CD4+CD45RC+ T-Zellen

Um den Aktivierungszustand der T-Helferzellen näher zu analysieren, wurde eine Doppelfärbung von CD4 in Verbindung mit CD25 und CD45RC durchgeführt. Sowohl CD25, als auch CD45RC sind Marker der T-Zell-Aktivierung, wobei CD25 unter anderem mit regulatorischen T-Zellen (Treg) assoziiert wird, deren antiinflammatorische Eigenschaften durch ein bestimmtes Zytokinprofil (IL-10 und TGF- β) gekennzeichnet sind. IL-10 steht mit Langzeittoleranz in Verbindung. Es zeigte sich eine nahezu identische Expression der CD4+CD25+ T-Zellen bei Tieren mit Th2-Zell-Klon Behandlung und der syngenen Kontrolle; diese Signifikanz wurde bei der beschleunigten chronischen Abstoßung (Th1-Zell-Klon Behandlung) und CsA-Therapie nicht beobachtet.

CD4⁺CD45^{RC+} T-Zellen fanden bei Th1-Zell-Klon Behandlung und CsA-Therapie beachtliche Relevanz. Tiere, die eine Langzeittoleranz aufwiesen (Th2-Zell-Klon Behandlung), und der syngenen Kontrolle (LEW->LEW) zeigten keine erhöhte Expression dieser Zellen.

CD4+CTLA-4+ T-Zellen

Um die T-Zellen näher auf einen möglichen regulatorischen Phänotyp zu untersuchen, wurde der CTLA-4 Marker in Kombination mit CD4 in einer Doppelmarkierung veranschaulicht. Die Ergebnisse bei Langzeittoleranz (Th2-Zell-Klon Behandlung) geben einen Hinweis auf das Vorhandensein dieses und legen die Existenz regulatorischer T-Zellen bei Langzeitorganakzeptanz zugrunde, verglichen mit Tieren der syngenen Kontrolle (LEW->LEW). Jedoch wurde keine signifikante Expression von CD4⁺CTLA-4⁺ T-Zellen in Tieren mit beschleunigter chronischer Abstoßung sowie bei Tieren unter CsA-Therapie beobachtet.

B7-1/ CD28 oder CTLA-4 und B7-2/CD28 oder CTLA-4

Sowohl B7-1 als auch B7-2 sind in der Lage, das CD28- und CTLA-4-Oberflächenmolekül zu binden. CD28 scheint eine Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen zu spielen, während CTLA-4 vermutlich eine Funktion als inhibitorischer Rezeptor für die Herunterregulierung der Immunantwort besitzt. Darüber hinaus beeinflusst CD28 möglicherweise auch die Differenzierung von Th-Zellen. CTLA-4 soll zudem eine Rolle bei der T-Zelltoleranz spielen. Die Doppel-färbung mit einem anti-B7-1- oder -B7-2- und einem anti-CD28-Antikörper zeigte bei Tieren mit beschleunigter chronischer Transplantatabstoßung (Th1-Zell-Klon Behandlung) eine erhöhte Expression. Bei individueller Betrachtung der B7-1 und B7-2 Moleküle war folgender Unterschied feststellbar: während die Bindung zwischen B7-1 und CD28 schwach nachweisbar war, fand sich für B7-2 und CD28 eine deutliche Expression. In nicht behandelten (LEW->LEW) und langzeittoleranten Tieren (Th2-Zell-Klon-Behandlung) war diese Expression wesentlich geringer ausgeprägt. Dagegen fand sich eine erhöhte Expression von B7-2/CTLA-4 bei Langzeitorganakzeptanz (Th2-Zell-Klon Behandlung) und bei Kontrolltieren. Tiere mit beschleunigter chronischer Abstoßung (Th1-Zell-Klon Behandlung) und CsA-Behandlung wiesen dagegen nur eine geringere Expression auf.

ELISPOT Analyse: Tiere unter Gabe von Th1-Zell-Klon oder alleiniger Gabe von CsA wiesen eine deutlich erhöhte Expression an IFN- γ auf. Im Gegensatz dazu

produzierten Tiere mit Th2-Zell-Klon Behandlung vermehrt IL-10. Diese Erkenntnisse definierten den Phänotyp der Transplantatantwort bei Empfängern unter Th1-Zell-Klon und Th2-Zell-Klon Behandlung.

Gen-Analyse: Die Genexpression von IL-1 β , TNF- α , MCP-1 und TGF- β ergab eine signifikante Erhöhung bei Tieren mit Th1-Zell-Klon Behandlung und Tieren mit alleiniger CsA-Behandlung. Unter Th2-Zell-Klon-Transfer ergab sich eine nur minimal erhöhte Expression der genannten Faktoren, die sich nicht signifikant zur syngeneten Kontrolle unterschied.

Die vorliegenden Ergebnisse stellen einen erstmaligen Nachweis der regulatorischen Funktion allospezifischer Th2-Zell-Klone mit phänotypischem Zytokinprofil (IL-4 und IL-10) in einem allogenen Transplantatmodell dar. Die Daten weisen auf die funktionelle regulatorische Rolle spezifischer Th2-Zellen in vitro und in vivo und ihre Bedeutung bei der Unterdrückung chronischer Abstoßung hin.

5. Beantwortung der Fragen

Die mit der Zielsetzung dieser Arbeit verbundenen Experimente sollten die Bedeutung der molekularen und zellulären Mechanismen der indirekten Alloantigenerkennung nach experimenteller Nierentransplantation klären. Hierbei wurde der Charakterisierung bestimmter dominierender Peptidsequenzen und T-Zellenrezeptoren (TCRV β) bei gegebenem MHC-Klasse-II Mismatch ein besonderer Stellenwert beigemessen. Dazu wurden zunächst im Tiermodell mit entweder stabiler Transplantatfunktion oder solchen mit akuter Abstoßung alloreaktive T-Zellen-Klone etabliert, daraufhin in vitro näher charakterisiert und in vitro und in vivo funktionell analysiert.

1. Welche unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften weisen die aus chronisch abstoßenden und die, mit langfristiger Organakzeptanz hergestellten Th1 und Th2-Zell-Klone in vitro auf?

Eine der möglichen funktionellen Bedeutungen der Th2-Zellen besteht in deren regulatorischen Einflussnahme auf Th1-Zellen im Rahmen der Immunantwort. Die Addition von Th2-Zell-Klon, spezifisch für RT1.D^u β (20-44) Peptid, reduzierte die Reaktivität der Th1-Zell-Klone mit Spezifität für dasselbe Peptid signifikant.

Der Th2-Zell-Klon exprimiert IL-4 und IL-10 nach jeweiliger alleiniger Stimulierung mit dem Allopeptid. Die Untersuchung der exprimierten Zytokine von Th1-Zell-Klon aus den Überständen dieses Zellkultur-Systems ergab unter Zugabe des Th2-Zell-Klons, eine reduzierte Produktion von IFN- γ um 78,2%, nicht jedoch von IL-2.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Th2-Zellen die Funktion der Th1-Zellen in vitro herunterregulieren können.

2. Welche regulatorischen Eigenschaften haben die aus unbeeinflussten, langfristig überlebenden Empfängern hergestellten Th2-Zell-Klone in vivo?

Lymphozyten, die gleichzeitig CD4 und CD25 exprimieren, sind essentiell für die Selbst-Toleranz und werden als regulatorische T-Zellen bezeichnet. T regulatorische Zellen induzieren Langzeittoleranz durch Hemmung autoreaktiver Lymphozyten.

Naiven LEW-Tieren wurde dazu der T-Zell-Klon intraperitoneal injiziert. Nach fünf Tagen wurden diesen Tieren entweder RT1.D^uβ(20-44) Peptid oder bestrahlte spenderspezifische (WF) Milzzellen subkutan verabreicht und anschließend nach 48 Stunden die DTH Antwort bestimmt. Übereinstimmend mit den beschriebenen Ergebnissen in vitro zeigte sich nach Übertragung von TCR Vβ9 exprimierenden Th1-Zell-Klon aus dem abstoßenden Tier eine signifikante Immunantwort vom verzögerten Typ, die DTH Antwort (DTH = Delayed Type Hypersensitivity).

Dies fand sich nicht nach Übertragung vom TCR Vβ9 exprimierenden Th2-Zell-Klon aus dem toleranten Tier. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass das Ausbleiben einer DTH Antwort die Unfähigkeit der Zellen war, in vivo zu expandieren oder zum Standort des Antigens zu wandern, wurde eine Mischung von Th1- und Th2-Zell-Klonen mit dem RT1.D^uβ(20-44) Peptid lokal intradermal in die Ohren injiziert. Daraufhin wurden die DTH Antworten gemessen. Die Ergebnisse waren mit denen bei Th2-Zell-Klon Gabe vergleichbar und bestätigen die regulatorische Funktion der Th2-Zellen in vivo.

3. Welches charakteristische Zytokinprofil wird bei einer Langzeittoleranz und welches bei einer chronischen Transplantatabstoßung beobachtet?

Hierbei spielt die Dichotomie der CD4⁺ T-Helferzellen in zwei unterschiedliche Populationen, von denen jede ihr eigenes Profil an Zytokinen produziert und damit ihrer eigenen Effektorfunktionen vermittelt, eine wichtige Rolle. T-Helferzellen vom Typ1 (Th1-Zellen), IL-2 und IFN-γ produzierend, führen ferner zur Aktivierung von Makrophagen und induzieren eine Immunantwort vom verzögerten Typ, die DTH Antwort. T-Helferzellen vom Typ2 produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die der Regulation der B Zell-Funktionen dienen. T-regulatorische Zellen sind durch die Zytokine IL-4, IL-10 und TGFβ charakterisiert, haben einen anti-inflammatorischen Effekt und treten bei Langzeittoleranz der Nierentransplantate verstärkt auf.

Die syngene Kontrolle ist nur durch ein geringes Maß an IL-1β gekennzeichnet. Tiere, die nur einer CsA-Therapie unterlagen, exprimierten ein hohes Maß an inflammatorischen Zytokin-Genen: IL-1β, IL-6, TNF-α und IFN-γ. Eine noch höhere Expression dieser Gene, mit Ausnahme von TNF-α, wiesen Tiere auf, die neben CsA Th1-Zell-Klon bekamen. Nieren aus Th2-Zell-Klon + CsA behandel-

ten Tieren, exprimierten vor allem IL-10 und geringe Mengen an IL-1 β . Bei simultanem Einsatz von Th1+Th2-Zell-Klon und CsA fand sich ebenfalls eine hohe IL-10 Expression, wobei nur geringe Mengen an IL-1 β , IL-6 und TNF- α detektiert wurden.

Die immunhistologischen Ergebnisse der Nieren aus Th1-Zell-Klon und Th2-Zell-Klon behandelten Tieren zeigten vergleichsweise identische Akkumulationen an mononukleären Zellen und CD4+ T-Zellen. In Gefrierschnitten aus beiden Präparaten war nur eine geringe Zahl an CD8+ T-Zellen erkennbar. Der Th1-Zell-Klon Transfer ging mit einer hohen Beteiligung des inflammatorischen Zytokins IFN- γ einher. Bei Tieren, die einem Th2-Zell-Klon Transfer unterlagen, war dieser inflammatorische Prozess nicht detektierbar, jedoch ein deutlicher IL-10 Nachweis. Weiterhin war eine deutliche Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 und des Th2-Zell-Markers T1/ST2 ersichtlich, welche unter Th1-Zell-Klon-Transfer nicht nachgewiesen wurden. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen das detektierte Zytokin-Gen-Profil, welches in den Organen der Tiere mit Th1- bzw. Th2-Zell-Klon Transfer durch RNase Protection Assay gefunden wurde. Der Nachweis von GATA-3 und T1/ST2 liefert einen Hinweis für regulatorische T-Zellen.

4. Welche morphologischen Charakteristika kennzeichnen die regulatorischen Zellen in vivo?

Um die morphologische Veränderungen bei Tieren mit chronisch abgestoßen Nieren festzustellen, wurden histologische Untersuchungen (Morphologie) durchgeführt. Tiere der syngenen Kontrolle zeigten keine Veränderung. Unter CsA-Therapie dagegen waren progressive Veränderungen einer chronischen Nephropathie ersichtlich. Nach Zugabe von Th1-Zell-Klon (beschleunigte chronische Abstoßung) war eine deutliche Zellinfiltration mit intensivierten chronischen Veränderungen erkennbar. Keine Anzeichen einer chronischen Abstoßung wurden bei Langzeittoleranz (Th2-Zell-Klon-Behandlung) festgestellt. Tiere, die nicht länger als 250 Tage überlebten (Th1 + Th2-Zell-Klon), zeigten Anzeichen einer chronischen Abstoßung; die Hälfte der Tiere aus dieser Gruppe überlebte länger als 250 Tage ohne histomorphologische Anzeichen einer chronischen Abstoßung. Diese Ergebnisse stehen im engen Zusammenhang mit den Überlebensdaten der Tiere.

5. Welche co-stimulatorischen Signale werden mit einer Langzeittoleranz und welche mit einer beschleunigten, chronischen Transplantatabstoßung in Verbindung gebracht?

T-Zellen benötigen zur vollständigen Aktivierung nach Antigenerkennung zwei verschiedene Signale. Das Signal 1 wird aus dem Komplex von T Zellrezeptor und dem dazugehörigen Peptid zusammen mit MHC auf APC's gebildet. Das Signal 2 setzt sich aus einem oder mehreren co-stimulatorischen Oberflächenrezeptoren auf der T Zelle und dazugehörigem Liganden auf APC's zusammen. Das zweite – co-stimulatorische – Signal ist erforderlich, um eine apoptotische oder anerge (Zustand fehlender Reaktion auf Antigene) Antwort durch den Lymphozyten zu vermeiden. Die Interaktion von CD 28 auf dem Lymphozyten mit B-7 Proteinen auf einer APC liefert das notwendige co-stimulatorische Engagement der APC.

CD4+ T-Zellen und Makrophagen

Die Anzahl von Makrophagen (ED1) und CD4+-T-Helferzellen wurde analysiert, um inflammatorische Prozesse als Ursache der chronischen Transplanatabstoßung zu untersuchen. Tiere unter Th1-Zell-Klon Behandlung wiesen eine deutliche Anzahl von diesen Zellen auf, wohingegen bei Tieren der syngenen Kontrolle, bzw. Th2-Zell-Klon Behandlung, eine geringe Beteiligung detektiert wurde.

CD4+CD25+ und CD4+CD45RC+ T-Zellen

Um den Aktivierungszustand der T-Helferzellen näher zu analysieren, wurde eine Doppelfärbung von CD4 in Verbindung mit CD25 und CD45RC durchgeführt. Sowohl CD25 als auch CD45RC sind Marker der T-Zell-Aktivierung, wobei CD25 unter anderem mit regulatorischen T-Zellen assoziiert wird, deren antiinflammatorische Eigenschaften durch ein bestimmtes Zytokinprofil (IL-10 und TGF- β) gekennzeichnet sind. Es zeigte sich eine nahezu identische Expression von CD4+CD25+ T-Zellen bei Tieren mit Th2-Zell-Klon Behandlung und der syngenen Kontrolle; diese Signifikanz wurde bei der beschleunigten chronischen Abstoßung (Th1-Zell-Klon Behandlung) und CsA-Therapie nicht beobachtet.

CD4⁺CD45^{RC+} Lymphozyten fanden bei Th1-Zell-Klon Behandlung und CsA-Therapie beachtliche Relevanz. Tiere, die eine Langzeittoleranz aufwiesen (Th2-Zell-Klon Behandlung), und der syngenen Kontrolle (LEW->LEW) zeigten keine erhöhte Expression dieser Zellen.

CD4⁺CTLA-4⁺ T-Zellen

Um die T-Zellen näher auf einen möglichen regulatorischen Phänotyp zu untersuchen, wurde der CTLA-4 Marker in Kombination mit CD4 in einer Doppelmarkierung veranschaulicht. Die Ergebnisse bei Langzeittoleranz (Th2-Zell-Klon Behandlung) geben einen Hinweis auf das Vorhandensein dieses Zelltyps und legen die Vermutung der Existenz regulatorischer T-Zellen bei Langzeitorganakzeptanz zugrunde, verglichen mit Tieren der syngenen Kontrolle (LEW->LEW). Jedoch wurde keine signifikante Expression des CD4⁺CTLA-4⁺ T-Zellen in Tieren mit beschleunigter chronische Abstoßung (Th1-Zell-Klon) sowie bei Tieren unter CsA-Therapie beobachtet.

B7-1/ CD28 oder CTLA-4 und B7-2/CD28 oder CTLA-4

Sowohl B7-1 als auch B7-2 sind in der Lage, das CD28- und CTLA-4-Oberflächenmolekül zu binden. CD28 scheint eine Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen zu spielen, während CTLA-4 vermutlich eine Funktion als inhibitorischer Rezeptor für die Herunterregulierung der Immunantwort besitzt. Darüber hinaus beeinflusst CD28 möglicherweise auch die Differenzierung von Th-Zellen. CTLA-4 soll zudem eine Rolle bei der T-Zelltoleranz spielen. Die Doppel-färbung mit einem anti-B7-1- oder -B7-2- und einem anti-CD28-Antikörper zeigte bei Tieren mit beschleunigter chronischer Transplantatabstoßung (Th1-Zell-Klon Behandlung) einen erhöhte Expression. Bei individueller Betrachtung der B7-1 und B7-2 Moleküle war folgender Unterschied feststellbar: während B7-1/CD28 schwach nachweisbar war, fand sich für B7-2/CD28 eine deutliche Expression. In nicht behandelten (LEW->LEW), und langzeittoleranten Tieren (Th2-Zell-Klon-Behandlung), war diese Expression wesentlich geringer ausgeprägt. Dagegen fand sich eine erhöhte Expression von B7-2/CTLA-4 bei Langzeitorganakzeptanz (Th2-Zell-Klon Behandlung) und bei Kontrolltieren (LEW->LEW). Tiere mit beschleunigter chronischer Abstoßung (Th1-Zell-Klon Behandlung) und CsA-Behandlung wiesen dagegen nur eine geringere Expression auf.

Diese Arbeit zeigt für Th1-Zellen in vivo eine pathogene Rolle bei der Transplantatabstoßung auf. Th2-Zellen üben dagegen eine protektive Rolle bei Herunterregulierung der Th1-Zellen in vitro and in vivo aus. Sie induzieren damit eine Toleranz, nachgewiesen durch die Hauttransplantation.

6. Diskussion

An der chronischen Transplantatabstoßung sind nach derzeitiger Erkenntnis aus experimentellen Modellen letztlich alle zellulären und humoralen Elemente des Immunsystems beteiligt, wobei die T-Zell-gesteuerte Immunantwort dominiert. Die spezifische Antigenerkennung, das zentrale Ereignis der zellulären Immunantwort bei der Transplantatabstoßung, beruht auf der Interaktion von Antigenpräsentierenden Zellen (APC = dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) mit T-Lymphozyten, mit der Folge, dass diese aktiviert werden. Die kommunizierenden Zellen, T-Zellen und APC, richten sich dabei danach, ob das Antigen als Komplex aus Peptid und MHC-Molekül exogener oder endogener Herkunft ist. In beiden Fällen werden diese als Komplex aus Peptid und MHC-Molekül erkannt. Exogene Antigene werden zusammen mit MHC-Klasse-II-Molekülen auf APC von CD4⁺ T-Zellen erkannt, während endogene Antigene gemeinsam mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf APC mit CD8⁺ T-Zellen interagieren. Das genaue Verständnis der T-Zell-Aktivierung erscheint nach bisherigem Erkenntnistand unabdingbar für die Therapie transplantierte Patienten. So sind die immunologischen Mechanismen Ausgangspunkt der immunsuppressiven Medikation, auf die später noch eingegangen wird. Ob T-Zellen proliferieren und zu T-Effektorzellen werden, hängt entscheidend von dem ausgeschütteten Zytokin Interleukin-2 (IL-2) ab (55, 56). Sie benötigen nach heutiger Erkenntnis zur vollständigen Aktivierung zwei Signale. Der T-Zell-Rezeptor bindet an sein spezifisches Peptid, das zusammen mit dem MHC-Komplex auf den APC präsentiert wird. Dieses Ereignis ist das erste Signal. Ein co-stimulatorisches Signal, das so genannte zweite Signal, aktiviert anschließend unter anderem Tyrosinkinasen (ZAP-70, Fyn) innerhalb der T-Zelle (57, 58). Nach der Antigenerkennung werden von den T-Zellen, aber auch den beteiligten APC, Zytokine und Chemokine ausgeschüttet, die sowohl eine angeborene Immunantwort, als auch spezifische Antikörperreaktionen, sowie eine durch CD8⁺ T-Zellen vermittelte zytotoxische Immunreaktion hervorrufen (59, 60). Dies führt zur Abstoßung des Transplantates. Dabei lösen nach heutigem Verständnis unspezifische inflammatorische Prozesse unmittelbar nach Transplantation die allospezifische T-Zell-gebundene Immunreaktion mit aus. Bisherige immunsuppressive Regime verhindern weder die Antigenerkennung noch die Ausbildung von T-Gedächtnis-

(Memory)Zellen. Aus klinischer Sicht wäre zu fordern, dass nachfolgende T-Zell-gebundene chronische Immunreaktionen unter einer modernen Immunsuppression dauerhaft und zuverlässig unterdrückt werden. Verschiedene Arbeitsgruppen sehen in einem chronisch andauernden zellulären Immunprozess die Erklärung für eine schrittweise Zerstörung des Transplantates (61).

Die T-Zellerkennung bleibt das grundlegende Ereignis, das den zellulären Abstoßungsprozess in Gang setzt und schließlich zum chronischen Transplantatverlust führt (62, 63). Die zwei unterschiedlichen Wege der Antigenerkennung werden mit verschiedenen Phasen der Transplantatabstoßung in Verbindung gebracht. Voraussetzung für den direkten Weg sind mitübertragene APC, da nur sie über das benötigte co-stimulatorische Signal für die T-Zell-Aktivierung verfügen (64). Nach wenigen Wochen werden die mitübertragenen Spenderzellen jedoch eliminiert (65), und der direkte Weg der Allo-Erkennung tritt in den Hintergrund (66-68). Diesem Weg wird während der frühen Transplantatabstoßung übereinstimmend eine dominierende Rolle zugesprochen. Der indirekte Weg gewinnt dagegen nach heutiger Meinung bei der chronischen Transplantatabstoßung an Bedeutung (40). Zudem ist er für die Delayed Type Hypersensitivity (DTH)-Antwort, eine Immunantwort vom verzögerten Typ, wesentlich verantwortlich (69-73). Bei der indirekten Erkennung spielt für die Immunantwort allein das präsentierte Allo-Peptid die entscheidende Rolle. Vorstellbar wäre somit, zukünftig eine verminderte Immunantwort gegen dominante Peptide im Empfänger auszulösen. Zum Transplantationszeitpunkt gegeben, könnten sie dazu beitragen, die Abstoßung zu verhindern. Die vorliegenden Ergebnisse der eigenen Arbeit belegen dazu ihren modulierenden Effekt auf die Allo-Immunantwort. Mit dem indirekten Weg kann folglich unter Verwendung synthetischer Peptide aus dem Bereich dominanter Peptide im MHC-Klasse-II-Bereich gezielt in die entstehende Immunantwort eingegriffen werden. Dies kann beispielsweise durch Beeinflussung des Zell-Zyklus, der Signaltransduktion oder auch durch Induktion von Apoptose erfolgen. Vorstellbar wäre, gemeinsam mit einer konventionellen Immunsuppression, eine spezifischere Modulation der Immunantwort und letztlich die Induktion einer allospezifischen Transplantattoleranz.

Toleranz, die gegenüber einem oder mehreren relevanten Allo-Antigenen gleichzeitig entsteht, wird als erworbene oder optionale Toleranz bezeichnet (74). Sie ist durch eine ausbleibende Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen bei zugleich fortbestehender Reaktivität gegenüber anderen Antigenen gekennzeichnet (75).

Strategien, die gegenwärtig zur Induktion von Toleranz eingesetzt werden, verfolgen Mechanismen, die auch gegenüber körpereigenen Strukturen vorgefunden werden (sogenannte Selbst-Toleranz). Diese beruhen auf einer Deletion oder einer Regulation von T-Zellen. In Großtierstudien wurden dazu verschiedentlich nicht-myeloablative Konditionierungsprotokolle mit T-Zell-depletierenden Antikörpern verwendet. Der darüber hervorgerufene gemischte Zell-Chimärismus nach Knochenmarktransplantation erwies sich als eine effektive Möglichkeit, im Empfänger Toleranz zu induzieren (76). Bei einem Zell-Chimärismus existieren spenderspezifische neben empfängereigenen hämatopoetischen Zellen in einem Empfänger. Dieses für die Klinik vorstellbare therapeutische Prinzip muss dabei nicht auf einem dauerhaften Chimärismus beruhen. Einzelfallbeschreibungen einer kombinierten Nieren- und Knochenmarktransplantation mit induzierter funktioneller Toleranz unterstützen diese Annahme (77).

Nach heutiger Auffassung ist die akute Transplantatabstoßung eine vorwiegend Th1-vermittelte Immunantwort. Diese kann jedoch auch in Abwesenheit von IL-2 (78) oder IFN- γ (79) auftreten, wie in spezifischen Zytokin-Gen-Knockout-Mäusen gezeigt wurde. Danach erscheinen nicht alle Th1-assoziierten Zytokine notwendig, um eine Abstoßung auszulösen. Th2-Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13) supprimieren dagegen die zellvermittelte Immunität (80). Interessanterweise zeigen Autoimmunitäts- und Transplantationsstudien bei Induktion von Toleranz eine Immundeviation vorwiegend in Richtung der Th2-Zellfunktionen. Insbesondere durch eine co-stimulatorische T-Zell-Blockade waren Th1-Zytokine inhibiert und Th2-Zytokin-Antworten stimuliert (32, 81-83). Untersuchungen sollten hierzu die Rolle der regulatorischen Zellen bei der Toleranzinduktion klären (84, 85). Die Existenz regulatorischer Zellen wurde in vitro durch Suppressor-Tests und in vivo durch adoptiven Transfer als Status übertragener Toleranz anschaulich

demonstriert (85, 86). Aktuelle Untersuchungen haben eine CD4/CD8-T-Zelle identifiziert, die einen antigenspezifischen CD8+ T-Zell-vermittelten Fas-abhängigen Zelltod reguliert (87). Diese Zellen haben jedoch kein Zytokinprofil vom Th2-Typ und repräsentieren nicht eine Th2-vermittelte T-Zellregulierung, wie in einer Reihe von Studien deutlich demonstriert wurde (84, 88, 89). Selbst hergestellte MHC Klasse-II-Allopeptid-spezifische Th1-Klone aus Nierentransplantaten abstoßender Empfänger transferieren spezifische DTH-Antworten in vivo. Dieses läßt auf ihre bedeutende Rolle bei der Pathogenese der Transplantatabstoßung schließen (43). In dieser Untersuchung stellten wir T-Zelllinien und Klone aus T-Zellen langfristig überlebender LEW-Empfänger von WF-Nierentransplantaten und akut abstoßender Empfänger her. Als antigene Zielstruktur, gegen die die T-Zellen aus diesen Empfängern zu Zell-Linien und Klone etabliert wurden, diente das von der β -Kette des WF-RT1.D-Bereichs (HLA-DR-identisch) abgeleitete immundominante MHC-Peptid RT1.D^u β 20-44. Damit sollte die mutmaßliche regulatorische Funktion der Th2-Klone in vitro und in vivo analysiert werden. Die physiologische Prozessierung des Alloantigens führte offensichtlich zur Präsentation zusätzlicher Epitope, die vorzugsweise von besonderen TCR-V β -Polymorphismen erkannt werden (90). Das Zytokinmuster dieser T-Zellen war mit der An- oder Abwesenheit einer Transplantatabstoßung assoziiert. Bei stabiler Transplantatfunktion im Empfänger fand sich in den in vitro gegen das Peptid angereicherten T-Zellen ein Th2-Zytokinmuster, während eine Transplantat-Dysfunktion mit einem Th1-Muster assoziiert war. Es gibt mittlerweile erste klinische Hinweise für eine kausale Verbindung zwischen der Zytokinproduktion der T-Zellen und der An- oder Abwesenheit einer Transplantat-Dysfunktion. Aus unseren Ergebnissen geht dazu eindeutig ein suppressiver Effekt der Th2-Zytokin-produzierenden T-Zellklone auf die proliferative Antwort in vitro und die IFN- γ -Produktion der Th1-Zytokin-produzierenden Klone hervor. In vivo wurde die DTH-Antwort durch Übertragung dieser Th2-T-Zellklone inhibiert. Die eigenen Ergebnisse sowie die anderer Gruppen (32, 35, 91) widerlegen damit die gegenteilige Ansicht eines kausalen Zusammenhanges zwischen einem Th2-Phänotyp und der Entwicklung chronischer Abstoßung (38).

Weiter konnte aufgezeigt werden, dass die mit von toleranten Tieren gewonnenen Th2-Zell-Klonen injizierten Tiere eine Toleranz gegenüber dem Nierenal-

lotransplantat erreichen, was durch die Akzeptanz der spenderspezifischen Hauttransplantate bewiesen wurde. Die Anreicherung regulatorischer T-Zellen, die Zytokine vom Th2-Typ exprimieren, wurde anhand der Immunhistologie in den Zielorganen beobachtet. Tiere, die von akut abgestoßenen Allotransplantaten Th1-Zell-Klone erhielten, stießen ihre Allotransplantate chronisch beschleunigt ab. Dies läßt vermuten, dass die Generation der regulatorischen T-Zellen auf natürliche Weise entstehen und aufgezeigt werden kann, wenn die aggressive Immunreaktion kontrolliert wird, wie in unserer Studie durch ein niedrig dosiertes CsA-Protokoll demonstriert. Dies bedeutet, dass angesichts einer reduzierten Menge von alloreaktiven T-Zellen regulatorische T-Zellen günstigere Bedingungen dafür finden funktionell zu entstehen, als die vorherrschende Population. Der aus toleranten Tieren gewonnene Th2-Zell-Klon kann einen Prozess der verknüpften Unterdrückung propagieren (44, 84, 92). Untersuchungen des Zelltransfers haben bestätigt, dass CD4⁺ regulatorische T-Zellen für diesen Effekt verantwortlich sein können, indem sie ein Phänomen der infektiösen Toleranz verursachen, ein Prozess, bei dem ein Set regulatorischer T-Zellen die Entwicklung weiterer Kohorten ermutigt. Der Prozess ist autark, sobald das Transplantat auf seinem Platz ist (93). Die T-Zellen Interaktionen durch die Zytokine und der Wettbewerb um APCs sind wahrscheinlich bedeutende Komponenten für die molekularen Interaktionen, die sowohl für die verknüpfte Suppression als auch für die infektiöse Toleranz entscheidend sind. Der Nachweis der Anreicherung von regulatorischen T-Zellen in unseren von mit Th2-Zell-Klonen injizierten Tieren erhaltenen Allotransplantaten, die von Th2-Typ-Zellen erzeugen, läßt darauf schließen, dass die regulatorischen T-Zellen das Gewebe zumindest teilweise gegenüber einem allospezifischen Angriff schützen.

Es gibt viele Hinweise darauf, dass hauptsächlich T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) für die Abstoßung von soliden Organtransplantaten verantwortlich sind. Diese T-Zellen erkennen Alloantigene (Spender MHC) auf der Zelloberfläche des Transplantates und werden somit zur Proliferation angeregt. Eines der wichtigsten Ereignisse während der T-Zellantwort ist deren Aktivierung. Die Antigenerkennung alleine reicht jedoch nicht aus, um diese zu aktivieren. Es ist inzwischen klar, dass T-Zellen mindestens zwei Signale benötigen, um voll aktiviert zu werden. Das erste antigenspezifische Signal, wie oben beschrieben, wird durch die

Bindung des T-Zellrezeptors mit dem Haupthistokompatibilitäts- und einem Peptidkomplex auf den Antigen präsentierenden Zellen gebildet. Das zweite costimulatorische Signal ist erforderlich, um eine apoptotische oder anerge Antwort des T-Lymphozyten zu vermeiden. Die Interaktion von CD28 auf dem T-Lymphozyten mit den B7 Proteinen seitens der APC liefert dieses notwendige costimulatorische Signal (94, 95). Sowohl B7-1 als auch B7-2 sind in der Lage, das CD28- und CTLA-4-Oberflächenmolekül zu binden (96). CD28 spielt eine Rolle bei der Aktivierung der T-Zelle, während CTLA-4 eine Funktion als inhibitorischer Rezeptor für das Herunterregulieren der Immunantwort besitzt (96, 97). Zudem beeinflusst CD28 möglicherweise auch die Differenzierung von Th-Zellen (98). Dagegen lassen jüngere Forschungsergebnisse darauf schließen, dass CTLA-4 eine Rolle bei der T-Zelltoleranz spielen könnte (96, 99). Im Vergleich zu den Th1-Zellen behandelten Tieren, zeigte sich immunhistologisch in der mit Th2-Zellen behandelten Gruppe nach der Transplantation ein gleiches CD4+ und CD8+ Zellinfiltrat im Transplantat. Unter den CD4+ Zellen befanden sich in den Th2-behandelten Tieren deutlich mehr CD4+CD25+ Zellen. Interessanterweise zeigte die Doppelfärbung mit einem anti-B7-1- oder -B7-2- und einem anti-CD28-Antikörper bei Tieren mit beschleunigter chronischer Transplantatabstoßung (Th1-Zell-Klon Behandlung) eine erhöhte Expression als bei Tieren mit Th2-Zell-Klon Behandlung. B7-1 oder B7-2 mit CTLA-4 waren in den mit Th2-behandelten Tieren stärker exprimiert als in der Th1-behandelten Gruppe. Dies könnte auf eine herunterregulierte Immunantwort hinweisen. Bemerkenswert ist, dass verstärkt CD4+CTLA-4+ Zellen in der mit Th2-behandelten Gruppe vorgefunden wurden. Unter dem Zellinfiltrat an CD4+ und CD8+ Zellen in dieser Gruppe war B7-1 oder B7-2 mit CD28 herunterreguliert, hingegen B7-1 oder B7-2 mit CTLA-4, wie oben erwähnt, stärker vorhanden. Damit wäre eine verstärkte Überführung aktivierter Zellen in einen anergen Zustand bei gleichzeitig vorgefundenen Zellen mit regulatorischen Charakter (CD4+CD25+ und CTLA-4) in diesen Transplantaten denkbar. Dieses Phänomen fand sich in Th1-behandelten Tieren nicht und ging morphologisch mit Zeichen einer chronischen Abstoßung einher.

In dieser Arbeit beschrieben wir erstmals die Charakteristika und Funktionen Th1- und Th2-alloreaktiver T-Zellen, die über den indirekten Weg hergestellt

wurden. Unsere Beobachtungen zeigen für Th1-Zellen in vivo eine pathogene Rolle bei der Abstoßung auf. Th2-Zellen üben dagegen eine protektive Rolle bei Regulierung der Th1-Zellen in vivo aus. Weiterhin wird die Rolle der Th2-Zell-Klone bei der Regulierung der chronischen Abstoßung und dem Verursachen einer Toleranz beschrieben.

7. Zusammenfassung

Autoimmunitäts- und Transplantationsmodelle weisen bei Induktion von Toleranz auf eine Immundeprivation, d. h. eine Umleitung der Immunantwort, hin. Über bestimmte Effektorarme mit Betonung der Th2-Zellfunktionen und gleichzeitiger Inhibition der Th1-Aktivierung wird so ein Zielorgan nicht abgestoßen. Für die Transplantation ist unbekannt, ob dieser Th1/Th2 Shift für die Transplantatfunktion langfristig schädlich oder nützlich ist.

Die mit der Zielsetzung dieser Untersuchung verbundenen Experimente sollten die molekularen und zellulären Mechanismen der Antigenerkennung nach Nierentransplantation klären. Charakterisiert wurden dominierende Peptidsequenzen und T-Zell-Rezeptor-Bindungsmuster bei gegebener MHC-Klasse-II-Inkompatibilität. Dazu wurden aus Tieren mit stabiler Transplantatfunktion oder akuter und chronischer Abstoßung alloreaktive T-Zell-Klone etabliert. Diese wurden *in vitro* näher charakterisiert und *in vitro* sowie *in vivo* funktionell analysiert. Die T-Zellen jeder Linie aus abstoßenden und toleranten Tieren exprimierten TCRV β 8.2 und 9. Jede T-Zell-Linie und jeder einzelne T-Zell-Klon wurden als CD4+ gekennzeichnet. Da die T-Zellen ihr spezifisches Alloantigen zusammen mit Selbst-MHC über den indirekten Weg erkannt haben, würde dieses mit der Hypothese einer MHC-Klasse-II-Restriktion der Zellen *in vivo* übereinstimmen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten die bisherige Vermutung einer direkten Korrelation exprimierter Zytokinmuster von *in vivo* sensibilisierten T-Zellen mit der An- oder Abwesenheit einer Transplantatabstoßung. Eine stabile Transplantatfunktion bei funktioneller Toleranz im Empfänger ist danach mit einem Th2-Zytokinmuster verbunden, eine Transplantatabstoßung dagegen mit einem Th1-Muster assoziiert. Die Daten weisen eindeutig auf eine kausale Verbindung zwischen dem zellulären Zytokinmuster und der An- oder Abwesenheit chronischer Abstoßung hin. Th2-Zytokin-produzierende T-Zellklone supprimierten, wenn sie in die Zellkultur hinzugegeben wurden, *in vitro* eindrücklich die proliferative Antwort und die Produktion von IFN- γ der Th1-Zytokin-produzierenden Klone. Ferner inhibierten sie die DTH-Antwort *in vivo*. Diese Beobachtungen sprechen klar

gegen eine von anderen Arbeitsgruppen teils vermutete aber nicht bewiesene gegenteilige Verbindung zwischen einer Th2-Antwort und einer chronischen Alloimmunantwort. Mittlerweile vorliegende klinische Daten einer eigenen Pilotstudie nach Nierentransplantation liefern den Beweis für eine biologische Relevanz der experimentellen Erkenntnisse für den Menschen. Um die Rolle der indirekten Alloerkennung bei der chronischen Abstoßung klinisch weiter zu definieren, sind jedoch eine größere Patientenstudie und Auswahl an HLA-DR-Molekülen erforderlich.

Neben diesen funktionellen Unterschieden von T-Helferzellen benötigen T-Zellen, um aktiviert zu werden, co-stimulatorische Signale, die in dieser Arbeit untersucht wurden. In den Tieren mit Th2-Behandlung war im Vergleich zu Th1-behandelten Tieren die Expression von B7-1 oder B7-2 mit CD28 deutlich schwächer, dagegen B7-1 / B7-2 mit CTLA-4 deutlich stärker exprimiert. Die immunhistologischen Ergebnisse (CD4+CD25+ und B7-1 / B7-2 mit CTLA-4) weisen auf das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen hin, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Funktion und Erhaltung des Transplantates spielen. Diese Transplantate zeigten im Langzeitverlauf keine funktionellen oder morphologischen Anzeichen einer chronischen Abstoßung.

Diese Untersuchung lieferte die erste Beschreibung der Charakteristika und Funktionen von Th1- und insbesondere von Th2-alloreaktiven T-Zell-Klonen, die über den indirekten Weg hergestellt wurden. Die Beobachtungen zeigen die pathogene Rolle von Th1-Zellen bei der Transplantatabstoßung und die regulierenden Eigenschaften von Th2-Zellen gegenüber Th1-Zellen in vivo anschaulich auf. Damit könnte sich zukünftig eine potentielle klinische Nutzung von Th2-Zellen nach Transplantation ergeben, die, bei frühzeitiger Gabe dieser Zellen, eine verbesserte spezifische Akzeptanz des Transplantates ermöglicht.

8. Literaturverzeichnis

1. Bonal J, Cleries M, Vela E: Transplantation versus haemodialysis in elderly patients. Renal Registry Committee. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12(2):261-4
2. Kahan BD: Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989; 321(25):1725-38
3. Vella JP, Sayegh MH: Interactions between cyclosporine and newer anti-depressant medications. *Am J Kidney Dis* 1998; 31(2):320-3
4. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA: FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992; 357(6380):692-4
5. Clipstone NA, Crabtree GR: Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357(6380):695-7
6. Barone G, Bunke CM, Choc MG, Jr., Hricik DE, Jin JH, Klein JB, Marsh CL, Min DI, Pescovitz MD, Pollak R, Pruett TL, Stinson JB, Thompson JS, Vasquez E, Waid T, Wombolt DG, Wong RL: The safety and tolerability of cyclosporine emulsion versus cyclosporine in a randomized, double-blind comparison in primary renal allograft recipients. The Neoral Study Group. *Transplantation* 1996; 61(6):968-70
7. Vella JP, Sayegh MH: Maintenance pharmacological immunosuppressive strategies in renal transplantation. *Postgrad Med J* 1997; 73(861):386-90
8. Vella JP, Mosher R, Sayegh MH: Kaposi's sarcoma after renal transplantation. *N Engl J Med* 1997; 336(24):1761
9. Cecka JM: The UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 2002:1-20
10. Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Najarian JS: The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation* 1994; 57(6):857-9
11. Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS: Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 55(4):752-6; discussion 756-7
12. Reinsmoen NL, Matas AJ: Evidence that improved late renal transplant outcome correlates with the development of in vitro donor antigen-specific hyporeactivity. *Transplantation* 1993; 55(5):1017-23
13. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC: A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332(6167):845-50
14. Madden DR: The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:587-622
15. Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J: Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 1996; 272(5264):1001-4
16. Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB: Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation* 1994; 57(9):1295-302
17. Benichou G, Tam RC, Soares LR, Fedoseyeva EV: Indirect T-cell allorecognition: perspectives for peptide-based therapy in transplantation. *Immunol Today* 1997; 18(2):67-71
18. Shoskes DA, Wood KJ: Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 1994; 15(1):32-8

19. Sherman LA, Chattopadhyay S: The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:385-402
20. Bretscher P, Cohn M: A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 1970; 169(950):1042-9
21. Salama AD, Sayegh MH: Alternative T-cell costimulatory pathways in transplant rejection and tolerance induction: hierarchy or redundancy? *Am J Transplant* 2003; 3(5):509-11
22. Kishimoto K, Dong VM, Sayegh MH: The role of costimulatory molecules as targets for new immunosuppressives in transplantation. *Curr Opin Urol* 2000; 10(2):57-62
23. Radvanyi LG, Shi Y, Vaziri H, Sharma A, Dhala R, Mills GB, Miller RG: CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* 1996; 156(5):1788-98
24. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA: CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1(5):405-13
25. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH: Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3(5):541-7
26. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK: Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 1997; 6(4):411-7
27. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA: CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991; 174(3):561-9
28. Tan P, Anasetti C, Hansen JA, Melrose J, Brunvand M, Bradshaw J, Ledbetter JA, Linsley PS: Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 1993; 177(1):165-73
29. Turka LA, Linsley PS, Lin H, Brady W, Leiden JM, Wei RQ, Gibson ML, Zheng XG, Myrdal S, Gordon D, et al.: T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(22):11102-5
30. Lin H, Bolling SF, Linsley PS, Wei RQ, Gordon D, Thompson CB, Turka LA: Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J Exp Med* 1993; 178(5):1801-6
31. Lenschow DJ, Su GH, Zuckerman LA, Nabavi N, Jellis CL, Gray GS, Miller J, Bluestone JA: Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(23):11054-8
32. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, Turka LA: CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 1995; 181(5):1869-74
33. Russell ME, Hancock WW, Akalin E, Wallace AF, Glysing-Jensen T, Willett TA, Sayegh MH: Chronic cardiac rejection in the LEW to F344 rat model. Blockade of CD28-B7 costimulation by CTLA4Ig modulates T cell and macrophage activation and attenuates arteriosclerosis. *J Clin Invest* 1996; 97(3):833-8

34. Chandraker A, Russell ME, Glysing-Jensen T, Willett TA, Sayegh MH: T-cell costimulatory blockade in experimental chronic cardiac allograft rejection: effects of cyclosporine and donor antigen. *Transplantation* 1997; 63(8):1053-8
35. Azuma H, Chandraker A, Nadeau K, Hancock WW, Carpenter CB, Tilney NL, Sayegh MH: Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(22):12439-44
36. Schaub M, Stadlbauer TH, Chandraker A, Vella JP, Turka LA, Sayegh MH: Comparative strategies to induce long-term graft acceptance in fully allogeneic renal versus cardiac allograft models by CD28-B7 T cell costimulatory blockade: role of thymus and spleen. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(5):891-8
37. Steele DJ, Laufer TM, Smiley ST, Ando Y, Grusby MJ, Glimcher LH, Auchincloss H, Jr.: Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med* 1996; 183(2):699-703
38. Shirwan H: Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? *Transplantation* 1999; 68(6):715-26
39. Sayegh MH, Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL, Carpenter CB: Induction of immunity and oral tolerance with polymorphic class II major histocompatibility complex allopeptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(16):7762-6
40. Watschinger B, Gallon L, Carpenter CB, Sayegh MH: Mechanisms of allo-recognition. Recognition by in vivo-primed T cells of specific major histocompatibility complex polymorphisms presented as peptides by responder antigen-presenting cells. *Transplantation* 1994; 57(4):572-6
41. Gallon L, Watschinger B, Murphy B, Akalin E, Sayegh MH, Carpenter CB: The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation* 1995; 59(4):612-6
42. Vella JP, Magee C, Vos L, Womer K, Rennke H, Carpenter CB, Hancock W, Sayegh MH: Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation* 1999; 67(12):1523-32
43. Waaga AM, Chandraker A, Spadafora-Ferreira M, Iyengar AR, Khoury SJ, Carpenter CB, Sayegh MH: Mechanisms of indirect allorecognition: characterization of MHC class II allopeptide-specific T helper cell clones from animals undergoing acute allograft rejection. *Transplantation* 1998; 65(7):876-83
44. Chen W, Murphy B, Waaga AM, Willett TA, Russell ME, Khoury SJ, Sayegh MH: Mechanisms of indirect allorecognition in graft rejection: class II MHC allopeptide-specific T cell clones transfer delayed-type hypersensitivity responses in vivo. *Transplantation* 1996; 62(6):705-10
45. Tary-Lehmann M, Hricik DE, Justice AC, Potter NS, Heeger PS: Enzyme-linked immunosorbent assay spot detection of interferon-gamma and interleukin 5-producing cells as a predictive marker for renal allograft failure. *Transplantation* 1998; 66(2):219-24

46. Matesic D, Lehmann PV, Heeger PS: High-resolution characterization of cytokine-producing alloreactivity in naive and allograft-primed mice. *Transplantation* 1998; 65(7):906-14
47. Karulin AY, Hesse MD, Tary-Lehmann M, Lehmann PV: Single-cytokine-producing CD4 memory cells predominate in type 1 and type 2 immunity. *J Immunol* 2000; 164(4):1862-72
48. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-9
49. Hancock WH, Whitley WD, Tullius SG, Heemann UW, Wasowska B, Baldwin WM, 3rd, Tilney NL: Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56(3):643-50
50. Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, Levinson D, Radbruch A, Kamradt T: T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(12):6930-5
51. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32(2):219-29
52. Verhaert P, Marivoet S, Vandesande F, De Loof A: Localization of CRF immunoreactivity in the central nervous system of three vertebrate and one insect species. *Cell Tissue Res* 1984; 238(1):49-53
53. Sternberger LA: The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. *J Histochem Cytochem* 1979; 27(12):1657
54. Chandraker A, Azuma H, Nadeau K, Carpenter CB, Tilney NL, Hancock WW, Sayegh MH: Late blockade of T cell costimulation interrupts progression of experimental chronic allograft rejection. *J Clin Invest* 1998; 101(11):2309-18
55. Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A: Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991; 251(4991):313-6
56. Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB: Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989; 244(4902):339-43
57. Sefton BM, Taddie JA: Role of tyrosine kinases in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(3):372-9
58. Hatada MH, Lu X, Laird ER, Green J, Morgenstern JP, Lou M, Marr CS, Phillips TB, Ram MK, Theriault K, et al.: Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 1995; 377(6544):32-8
59. Lang TJ, Nguyen P, Peach R, Gause WC, Via CS: In vivo CD86 blockade inhibits CD4+ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8+ T cell activation and CTL effector function. *J Immunol* 2002; 168(8):3786-92
60. Azuma M, Phillips JH, Lanier LL: CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol* 1993; 150(4):1147-59

61. Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI: Chronic graft loss. Immunological and non-immunological factors. *Contrib Nephrol* 2005; 146:54-64
62. Smith JD, Rose ML, Pomerance A, Burke M, Yacoub MH: Reduction of cellular rejection and increase in longer-term survival after heart transplantation after HLA-DR matching. *Lancet* 1995; 346(8986):1318-22
63. Lombardi G, Lechler R: The molecular basis of allorecognition of major histocompatibility complex molecules by T lymphocytes. *Ann Ist Super Sanita* 1991; 27(1):7-14
64. Hornick PI, Mason PD, Yacoub MH, Rose ML, Batchelor R, Lechler RI: Assessment of the contribution that direct allorecognition makes to the progression of chronic cardiac transplant rejection in humans. *Circulation* 1998; 97(13):1257-63
65. Lechler RI, Batchelor JR: Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med* 1982; 156(6):1835-41
66. 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(1):31-41
67. Batchelor JR, Welsh KI, Maynard A, Burgos H: Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke T-dependent alloimmunity. I. Retransplantation of (AS X AUG)F1 kidneys into secondary AS recipients. *J Exp Med* 1979; 150(3):455-64
68. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM: Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 1990; 171(1):307-14
69. Fangmann J, Dalchau R, Fabre JW: Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J Exp Med* 1992; 175(6):1521-9
70. Auchincloss H, Jr., Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH: The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(8):3373-7
71. Lee RS, Grusby MJ, Glimcher LH, Winn HJ, Auchincloss H, Jr.: Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 1994; 179(3):865-72
72. Benham AM, Sawyer GJ, Fabre JW: Indirect T cell allorecognition of donor antigens contributes to the rejection of vascularized kidney allografts. *Transplantation* 1995; 59(7):1028-32
73. 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(11):4114-9
74. Charlton B, Auchincloss H, Jr., Fathman CG: Mechanisms of transplantation tolerance. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:707-34
75. Schwartz RS, Leskowitz S: Immunological tolerance. *Science* 1969; 163(873):1364 passim
76. Kawai T, Cosimi AB, Colvin RB, Powelson J, Eason J, Kozlowski T, Sykes M, Monroy R, Tanaka M, Sachs DH: Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1995; 59(2):256-62

77. Buhler LH, Spitzer TR, Sykes M, Sachs DH, Delmonico FL, Tolkoff-Rubin N, Saidman SL, Sackstein R, McAfee S, Dey B, Colby C, Cosimi AB: Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 2002; 74(10):1405-9
78. Steiger J, Nickerson PW, Steurer W, Moscovitch-Lopatin M, Strom TB: IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J Immunol* 1995; 155(1):489-98
79. Konieczny BT, Dai Z, Elwood ET, Saleem S, Linsley PS, Baddoura FK, Larsen CP, Pearson TC, Lakkis FG: IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways. *J Immunol* 1998; 160(5):2059-64
80. Paul WE, Seder RA: Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994; 76(2):241-51
81. Khoury SJ, Gallon L, Verburg RR, Chandraker A, Peach R, Linsley PS, Turka LA, Hancock WW, Sayegh MH: Ex vivo treatment of antigen-presenting cells with CTLA4Ig and encephalitogenic peptide prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Immunol* 1996; 157(8):3700-5
82. Hancock WW, Sayegh MH, Zheng XG, Peach R, Linsley PS, Turka LA: Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(24):13967-72
83. Khoury SJ, Akalin E, Chandraker A, Turka LA, Linsley PS, Sayegh MH, Hancock WW: CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA4Ig prevents actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system. *J Immunol* 1995; 155(10):4521-4
84. Davies JD, Martin G, Phillips J, Marshall SE, Cobbold SP, Waldmann H: T cell regulation in adult transplantation tolerance. *J Immunol* 1996; 157(2):529-33
85. Onodera K, Lehmann M, Akalin E, Volk HD, Sayegh MH, Kupiec-Weglinski JW: Induction of "infectious" tolerance to MHC-incompatible cardiac allografts in CD4 monoclonal antibody-treated sensitized rat recipients. *J Immunol* 1996; 157(5):1944-50
86. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, Waldmann H: "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 1993; 259(5097):974-7
87. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L: Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000; 6(7):782-9
88. Onodera K, Hancock WW, Graser E, Lehmann M, Sayegh MH, Strom TB, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW: Type 2 helper T cell-type cytokines and the development of "infectious" tolerance in rat cardiac allograft recipients. *J Immunol* 1997; 158(4):1572-81
89. Dong VM, Womer KL, Sayegh MH: Transplantation tolerance: the concept and its applicability. *Pediatr Transplant* 1999; 3(3):181-92
90. Liu Z, Sun YK, Xi YP, Hong B, Harris PE, Reed EF, Suci-Foca N: Limited usage of T cell receptor V beta genes by allopeptide-specific T cells. *J Immunol* 1993; 150(8 Pt 1):3180-6

91. Hancock WW, Buelow R, Sayegh MH, Turka LA: Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med* 1998; 4(12):1392-6
92. Wong RL, Ruddle NH, Padula SJ, Lingenheld EG, Bergman CM, Rugen RV, Epstein DI, Clark RB: Subtypes of helper cells. Non-inflammatory type 1 helper T cells. *J Immunol* 1988; 141(10):3329-34
93. Waldmann H, Cobbold S: Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity* 2001; 14(4):399-406
94. Abbas AK, Sharpe AH: T-cell stimulation: an abundance of B7s. *Nat Med* 1999; 5(12):1345-6
95. Gonzalo JA, Delaney T, Corcoran J, Goodearl A, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ: Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 2001; 166(1):1-5
96. Green JM: The B7/CD28/CTLA4 T-cell activation pathway. Implications for inflammatory lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22(3):261-4
97. Boulougouris G, McLeod JD, Patel YI, Ellwood CN, Walker LS, Sansom DM: Positive and negative regulation of human T cell activation mediated by the CTLA-4/CD28 ligand CD80. *J Immunol* 1998; 161(8):3919-24
98. Tamura H, Dong H, Zhu G, Sica GL, Flies DB, Tamada K, Chen L: B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood* 2001; 97(6):1809-16
99. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zhang W, Straus D, Samelson LE, Thompson CB, Bluestone JA: Molecular basis of T cell in-activation by CTLA-4. *Science* 1998; 282(5397):2263-6

9. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
ACI	(RT ⁿ)-Ratten (Rattenstamm)
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierenden Zelle
AS	Aminosäure
AT	Activated T-cells (aktivierte T-Zellen)
BSA	Bovine Serum Albumine
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CD	Differenzierungscluster
CsA	Cyclosporin A
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein)
DAG	Diaglycerol
DC	dendritische Zelle
DTH	Delayed Type Hypersensitivity – Reaktion (Immunreaktion vom verzögerten Typ)
FACS	Fluorescent activated cell sorter (Fluoreszenzzellsorter)
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
Fyn	Tyrosinkinase
GS	Glomerulosklerose
GlyCAM	(Endothelzell)-Rezeptor für L-Selektin
Gp 120	Transmembranprotein des HIV (Rezeptor), das CD4 bindet
HCl	Salzsäure
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human Leukozyt Antigen (Haupthistkompatibilitätskomplex beim Menschen)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICAM	Interzellululäres Adhäsionsmolekül
ICOS	Induzierbarer Costimulator

Ig	Immunglobulin
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphat
LAM	Leukozyten-Adhäsionsmolekül
LEW	Lewis (Rattenstamm)
LFA-1	Lymphozytenfunktionsantigen-1
mAK	Monoklonaler Antikörper
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MCP-1	Macrophage chemoattractant and activating factor
MHC	Major Histokompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MNC	mononukleare Zellen
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells (Kernfaktor aktivierter T-Zellen)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NT _x	Nierentransplantation
PBS	Phosphated Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phykoerythrin
RT-PCR	Real Time PCR Analyse
TCR	T-cell-receptor (T-Zellrezeptor)
TGF- β	Transforming growth factor – β
T-reg.	regulatorische T-Zelle
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
WF	Wistar (RT ^u)-Ratten (Rattenstamm)

Persönliche Daten

Name: Martin Reinhold Grimm
Geburt: 10. Oktober 1977, Nürnberg
Familienstand: ledig
Eltern: Heinz Grimm
Siegrid Grimm
Geschwister: Christian Oliver Grimm
Michael Grimm

Bildungsweg

1984-1988: Hermann-Kolb-Grundschule, Nürnberg
1988-1997: Bertolt-Brecht-Gymnasium, Nürnberg
1997 Abitur
seit 5/1999: Studium der Zahnmedizin, Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
10/2001: Physikum (Zahnmedizin)
Juli 2004 Staatsexamen (Zahnmedizin)
seit August 2004: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum
Würzburg, Chirurgische Klinik und Poliklinik, Zentrum für
Operative Medizin (ZOM):
Abt. Molekulare Onkoimmunologie (MOI)
Juli 2005 Physikum (Medizin)

Klinische Ausbildung

9/2003: Famulatur in der Abteilung für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

Forschung

3/2002-2005: Doktorarbeit:
Untersuchung regulatorischer T-Zellen bei
Toleranzinduktion nach experimenteller Nierentransplantation
unter Berücksichtigung co-stimulatorischer Signalwege

Auszeichnungen und Preise

2003	Basic Sciences Symposium, Keystone, Colorado, USA <i>(Co-Preisträger)</i>
2003	European Society of Transplantation, Venice, Italien <i>(Co-Preisträger)</i>
2004	American Society of Transplantation, Boston, USA <i>(Co-Preisträger)</i>
2004	American Society of Nephrology, St. Louis, USA <i>(Co-Preisträger)</i>

Sportliche Ausbildung

Neben meiner schulischen und studentischen Tätigkeit habe ich bis zu meinem 14. Lebensjahr Schwimmen als Leistungssport betrieben, bis ich 1991 mit Karate begann.

1993 bis 2000 gehörte ich dem **Landeskader** im Bayerischen Karateverband e.V. an und 1994 bis 1999 der deutschen **Nationalmannschaft** im Kumite (DKV e.V.).

1994 wurde ich **Deutsche Meister** (Kumite + 70 kg) und 1997 **Europameister** mit dem Kumite Team.

Parallel zu meiner aktiven Laufbahn war ich langjährig als Trainer in zwei Vereinen tätig (Lizenz zum **B-Trainer Leistungssport** im Bayerischen Karateverband e.V.).

1994-2001:

- **Deutscher Meister** (Jugend) Kumite Einzel +70kg
- 5. Platz World - Cup Kumite Einzel Allkategorie
- 2. Platz World - Cup Kumite Team (Deutschland)
- 3. Platz Zürich Open Kumite Team (Deutschland)
- 5. Platz Europameisterschaft Junioren Team (Deutschland)

- 3. Platz Deutsche Meisterschaft (Junioren) Kumite Einzel +75 kg
- Shotokan - **Europameister** Junioren - Team (Deutschland)

2004:

- Prüfung zum **3.DAN (schwarzer Gürtel)** Karate

Meiner Doktormutter Frau **Professor Dr. Ana Maria Waaga-Gasser** und meinem Doktorvater **Herrn PD Dr. Martin Gasser** danke ich besonders für die Überlassung des Themas, die hilfreiche Anleitung zur selbstständigen wissenschaftlichen Tätigkeit und Ausarbeitung dieser Arbeit. Ganz herzlich möchte ich mich bei Ihnen zudem für die **stetig intensive Betreuung** während meiner experimentellen Tätigkeiten im Versuchslabor, sowie den vielen guten Anregungen bei der schriftlichen Ausfertigung danken. Die **außerordentlich gute Unterstützung** sowohl bei der Versuchskonzeption, als auch deren **unermüdliche Diskussionsbereitschaft** haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. **Ohne sie wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form sicherlich nicht möglich gewesen.** Herrn Dr. Gasser sei zudem für die Operation der Versuchstiere gedankt.

Im Übrigen gilt mein Dank ebenso den Mitarbeiterinnen des molekularen immunologischen Labors, Frau Andrea Trumpfheller und Frau Sabine Müller, für die Hilfe und Betreuung beim experimentellen Arbeiten im Labor und ihrem regen Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Allen Mitdotorandinnen und Mitdotoranden möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die interessanten Vorträge bei den Doktorandenseminaren danken.