

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und  
Kinderchirurgie

Chirurgische Klinik I

Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Immunbiologie der Transplantatabstoßung:  
Untersuchungen zum immunmodulatorischen Effekt  
Transplantat-relevanter Antigene**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
**Anne Cathrin Merklein, geb. Rohde**  
aus Georgsmarienhütte

Würzburg, März 2011

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. C. Otto  
**Korreferent:** Prof. Dr. med. C.-T. Germer  
**Dekan:** Prof. Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2011**

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Der Januskopf der Immunsuppression .....	1
1.2	Immunbiologie der Transplantatabstoßung.....	3
1.3	Zielsetzung.....	5
<b>2</b>	<b>Fragen.....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>8</b>
3.1	Versuchstiere .....	8
3.2	Transplantation.....	8
3.3	MHC-Klasse II-spezifische Allopeptide .....	9
3.4	Immunisierung.....	10
3.5	Immunsuppression .....	11
3.6	Zellisolierung .....	11
3.7	Versuchsgruppen .....	13
3.8	Untersuchungen .....	14
3.9	Statistische Auswertung .....	17
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>18</b>
4.1	Indirekter T-Lymphozytenproliferations-Assay zum Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten .....	18
4.2	Allopeptid-induzierte Effekte nach Organtransplantation.....	24
4.3	Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten nach Organtransplantation....	43
<b>5</b>	<b>Beantwortung der Fragen .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
6.1	Wege der Alloantigen-Erkennung .....	50
6.2	Modulation der Immunantwort durch synthetische Allopeptide .....	51
6.3	Kombinierter Einsatz von Peptiden und Cyclosporin A .....	54
6.4	Grundlagen der Toleranzentwicklung .....	56
<b>7</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

# 1 Einleitung

---

Die Organtransplantation wird bei einer Vielzahl von Erkrankungen als kurative Therapie eingesetzt. Sie stellt nicht nur eine lebensrettende Maßnahme – etwa bei Herz- oder Leberinsuffizienz – dar; durch sie kann auch die Lebensqualität der Patienten erheblich verbessert werden – wie bei Niereninsuffizienz oder Kurzdarmsyndrom. Im Gegensatz zur Herz-, Leber- oder Nierentransplantation, welche weltweit mit guten klinischen Ergebnissen durchgeführt werden, ist die Dünndarmtransplantation nur wenigen Spezial-Zentren vorbehalten.

Seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts wird die Dünndarmtransplantation intensiv in experimentellen Studien untersucht (Lillehei RC et al., 1959). Beim Menschen wurde sie erstmals in den 1960er Jahren angewandt; jedoch mit verheerenden Ergebnissen: Die Patienten überlebten jeweils nur Stunden oder Tage. Ursache hierfür waren die akute Transplantatabstoßung und postoperative Sepsis. Da der Dünndarm ein überaus immunkompetentes Organ ist, das über das GALT („gut associated lymphatic tissue“) – hierzu gehören Lymphozyten der Lamina propria, der Peyer-Plaques und der mesenterialen Lymphknoten – an der Abwehr von Fremdantigenen beteiligt ist (Monchik GJ und Russell PS, 1971), kommt es nach Transplantation zu einer starken Immunantwort. Durch Verbesserung der chirurgischen Technik, Gewebetypisierung und Reduzierung von Infektionen wurden die Überlebensraten nur unwesentlich verlängert.

## 1.1 Der Januskopf der Immunsuppression

Ein wesentlicher Durchbruch bei der Verlängerung der Überlebenszeit gelang erst mit Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin A bzw. später mit dem Einsatz von Tacrolimus (FK 506) (Lee KKW et al., 1990; Deltz E et al., 1990). Die Einnahme dieser Immunsuppressiva verhindert die akute Abstoßung in aller Regel sehr gut, doch stehen dem „Benefit“ eine Reihe gravierender Nebenwirkungen bei der Langzeitapplikation gegenüber. Das Problem besteht darin, dass beide Immunsuppressiva nicht nur die Funktion der T-Lymphozyten

hemmen, sondern auf das gesamte Immunsystem wirken (Isakov N et al., 1987; Hess AD et al., 1988). Diese geringe Spezifität führt dazu, dass nicht nur die an der Transplantatabstoßung beteiligten T-Lymphozyten in ihrer Reaktivität unterdrückt werden, sondern sämtliche von T-Lymphozyten vermittelten Abwehrreaktionen beeinträchtigt werden. Die Folgen sind ein gehäuftes Auftreten von Neoplasien – insbesondere der Haut und des lymphatischen Systems (Opelz G und Döhler B, 2004) – und opportunistische Infektionen (z.B. Pneumonien), die häufig letal verlaufen. Außerdem verursachen diese Immunsuppressiva toxische Organschäden – vor allem an Nieren und dem Nervensystem (Abramovicz D et al., 2000; Bechstein WO et al., 2000). Unter Tacrolimus wird zudem das Auftreten eines de-novo-Diabetes beobachtet (Braun F, 1998).

Zu diesen Nebenwirkungen kommt noch hinzu, dass sämtliche in der Klinik verwendeten Immunsuppressiva nicht in der Lage sind, die so genannte chronische Abstoßung, die das Transplantatüberleben in einem gravierenden Umfang limitiert, erfolgreich zu bekämpfen. Die chronische Transplantatabstoßung läuft unter Immunsuppression ab und stellt ein multifaktorielles Geschehen dar (Land W, 1996), dem sowohl immunologische Ursachen – wie etwa HLA-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger (Petersen P et al., 1995) – als auch unspezifische Ursachen zugrunde liegen (Land W, 1995).

Das Ziel einer optimierten postoperativen Therapie sollte somit sein, ausschließlich solche T-Lymphozyten-Untergruppen antigen-spezifisch zu hemmen, die an der Abstoßung des Organtransplantates beteiligt sind (Gorantla VS et al., 2000). Der Großteil des T-Zell-Repertoires sollte von dieser Therapie weitestgehend unbeeinflusst bleiben, damit diese auch weiterhin ihre Aufgaben bei der allgemeinen Abwehr von Infektionen und Krebserkrankungen (Neoplasien) übernehmen können. Vor allem das Verständnis der immunologischen Vorgänge während der Abstoßung stellt eine grundlegende Voraussetzung zur Entwicklung Antigen-spezifischer Immuntherapien mit dem Ziel dar, Transplantatlangzeitfunktion ohne generalisierte Immunsuppression zu ermöglichen.

## 1.2 Immunbiologie der Transplantatabstoßung

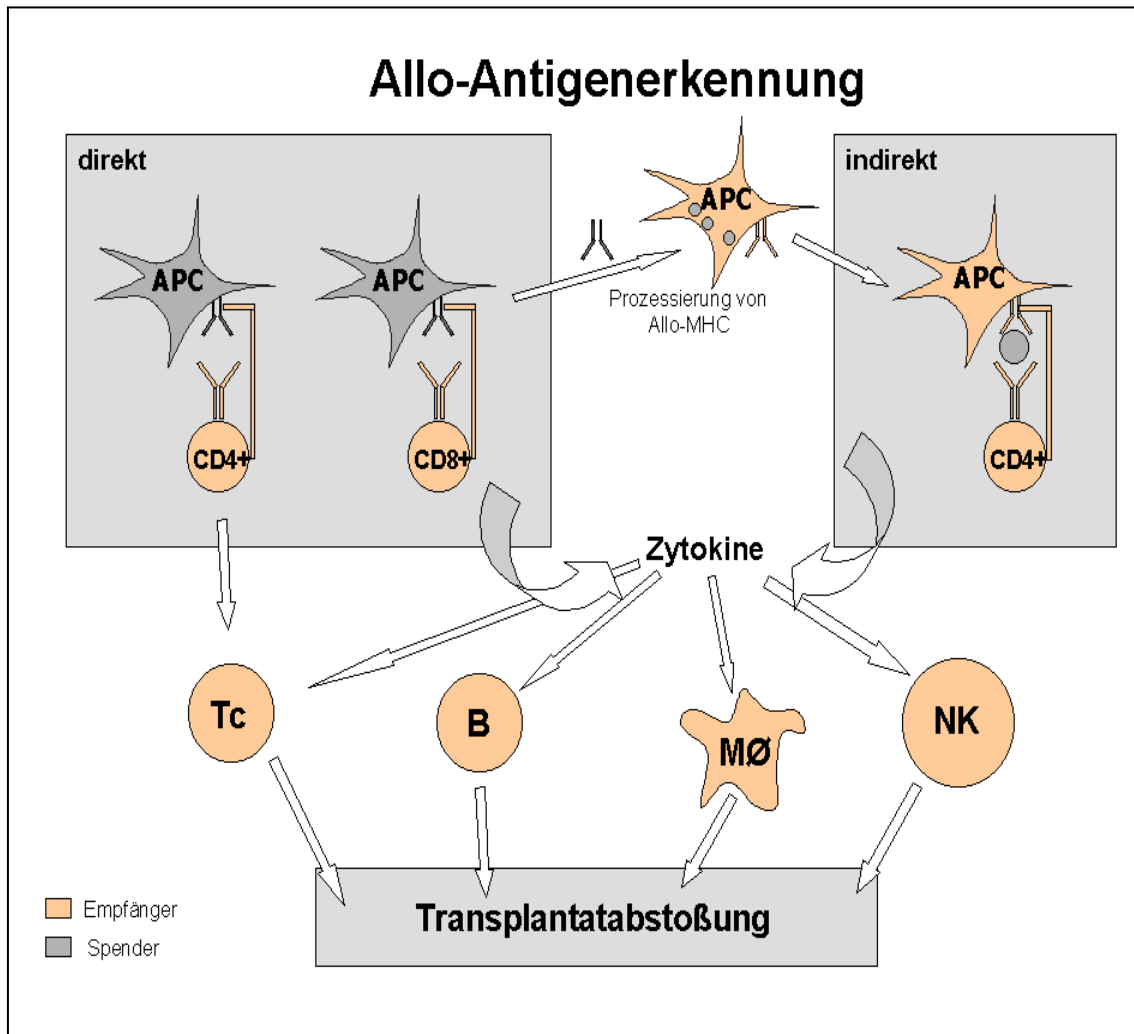
Die Transplantatabstoßung beruht im Wesentlichen darauf, dass sich Spender und Empfänger in ihren Oberflächenmolekülen, den so genannten Haupthistokompatibilitätskomplexen (*major histocompatibility complex* oder MHC), unterscheiden. Eine Transplantation, die zwischen zwei Individuen einer Art durchgeführt wird, die sich in den MHC-Molekülen unterscheiden, bezeichnet man als eine allogene Transplantation. In einer solchen Situation erkennen die T-Lymphozyten des Transplantatempfängers die allogenen MHC-Moleküle auf den Zellen des Spenderorgans als fremd. Hieraus resultiert eine, als Alloreaktivität bezeichnete, Aktivierung von T-Lymphozyten, die zur Transplantatdestruktion führt (Sayegh MH et al., 1994).

Nach Transplantation treten zwei verschiedene Mechanismen der T-Zell-Erkennung auf, die als direkte und indirekte Allo-Antigenerkennung bezeichnet werden, über die jeweils alloreaktive T-Lymphozyten aktiviert werden (Via CS et al., 1990).

Bei der direkten Allo-Antigenerkennung erkennen T-Lymphozyten ganze Allo-MHC-Moleküle: CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten binden direkt an Allo-MHC-Klasse II-Moleküle, CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten binden an Allo-MHC-Klasse I-Moleküle (Lechler RI et al., 1990 und 1991). In der Regel befinden sich diese MHC-Moleküle auf Spender-Leukozyten, die mit dem Organ transplantiert werden. Die Zahl dieser auch als „passenger leucocytes“ bezeichneten Zellen nimmt kontinuierlich ab. Deshalb ist die direkte Allo-Antigenerkennung vor allem unmittelbar nach Transplantation von Bedeutung.

Die indirekte Allo-Antigenerkennung entspricht der klassischen Antigenenerkennung, etwa im Rahmen von Infektionen. Hierbei erkennen CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten Peptide, die sich in der MHC-Klasse II-Rezeptortasche eigener antigenpräsentierender Zellen befinden. Diese Peptide sind Fragmente der allogenen MHC-Moleküle, die die antigenpräsentierenden Zellen zuvor aufgenommen und

prozessiert haben (Shoskes AD et al., 1994). Über Zytokine, die die aktivierten T-Lymphozyten ausschütten, werden verschiedene Effektorzellen wie z.B. zytotoxische T-Lymphozyten oder Makrophagen aktiviert, was zur Transplantatabstoßung führt.



**Abbildung 1: Direkter und indirekter Weg der Allo-Antigenerkennung.** Schematische Darstellung der T-Zellaktivierung mit nachfolgender Zytokinproduktion durch die aktivierten Zellen. Weitere Erläuterungen sind im Text zu finden. APC = antigenpräsentierende Zelle, T<sub>c</sub> = zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyt, B = B-Lymphozyt, MØ = Makrophage, NK = natürliche Killerzelle

Lange Zeit wurde der direkten Allo-Antigenerkennung die größere Bedeutung in der Transplantationsimmunologie zugeschrieben, da 90% der alloreaktiven T-Lymphozyten Allo-Antigene direkt erkennen (Whitelegg A und Barber LD, 2003). Seit den 90er Jahren ist aber immer deutlicher geworden, dass die Bedeutung der indirekten Allo-Antigenerkennung bis dahin unterschätzt wurde (Sayegh MH et al., 1994; Steele DJR et al., 1996). Im Gegensatz zur direkten Allo-Antigen-Erkennung ist die indirekte Allo-Antigenerkennung dauerhaft an die Präsenz des Organtransplantates gebunden; erst wenn dieses entfernt wird, kommt dieser Weg zum Erliegen (Rogers NJ und Lechler RI, 2001). Deshalb wird dieser Weg insbesondere für die chronische Abstoßung verantwortlich gemacht (Lee RS et al., 2001). Im Umkehrschluss gelang es, durch Manipulation der indirekten Allo-Antigenerkennung das Transplantatüberleben zu verlängern (Oluwole SF et al., 1995; Waaga AM et al., 1999): Hierzu wurden synthetische MHC-Klasse I- bzw. MHC-Klasse II-Peptide intrathymisch (Hancock WW et al., 1994; Fändrich F et al., 1999), oral (Zavazava N et al., 2000) bzw. in die Vena portae (Ghobrial RR et al., 1996) verabreicht.

### **1.3 Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit werden zwei synthetische Allo-MHC-Peptide, die jeweils 25 Aminosäuren der hypervariablen Region der  $\beta$ -Kette des MHC-Klasse II-Moleküls der Wistar Furth-Ratte entsprechen, untersucht. Diese Peptide wurden gewählt, da in den MHC-Klasse-II-Rezeptortaschen antigenpräsentierender Zellen besonders häufig Peptide gefunden wurden, die aus MHC-Molekülen prozessiert worden waren (Auchincloss Jr. und Sultan, 1996). Auch bezüglich der Länge solcher synthetischen Peptide wurde sich an den in MHC-Klasse-II-Rezeptortaschen gefundenen Peptiden orientiert (Rudensky AY et al., 1991). Durch die Applikation synthetischer Allo-MHC-Peptide kann man somit *in vivo* die MHC-Klasse-II-Moleküle antigenpräsentierender Zellen mit dem gleichen Peptid beladen und somit den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung gezielt stimulieren (Murphy B und Krensky AM, 1999). Die Spezifität einer T-Zell-vermittelten Immunantwort beruht auf der Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor, MHC-Klasse-II-Molekül und dem präsentierten Peptid (Sayegh MH et



al., 1994). Durch die Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen mit definierten Allo-MHC-Peptiden wird die Analyse der auf dieser Interaktion beruhenden immunologischen Effekte möglich.

In dieser Arbeit sollten die immunologischen Effekte der Allo-Antigenerkennung analysiert werden. Besonderes Augenmerk galt der Beeinflussung des Transplantatüberlebens nach prä- und intraoperativer Peptidapplikation. In einem weiteren Schritt sollte die Strategie überprüft werden, vor einer Organtransplantation die durch die beiden Allo-MHC-Peptide aktivierten T-Lymphozyten durch den gezielten Einsatz von relativ niedrigdosiertem Cyclosporin A zu eliminieren. Von dieser Strategie wurde sich erhofft, die Transplantatfunktion zu verlängern.

## 2 Fragen

---

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war zu klären, ob es im Experimentalmodell Ratte möglich ist, durch die gemeinsame Verabreichung spenderspezifischer MHC-Klasse II-Peptide und Cyclosporin A alloreaktive T-Lymphozyten des Empfängers gezielt zu depletieren und ob dies mit einer Verlängerung der Transplantatfunktion einhergeht.

Hierzu wurden Experimente im indirekten T-Lymphozyten-Proliferationsassay und im Transplantatmodell durchgeführt.

1. Aktivieren die synthetischen MHC-Klasse II-Peptide RT1.B2 und RT1.D2 alloreaktive T-Lymphozyten *in vivo* und lassen sich diese *in vitro* nachweisen?
2. Beschleunigen die synthetischen MHC-Klasse II-Peptide RT1.B2 und RT1.D2 die Transplantatabstoßung?
3. Verzögert die kombinierte Gabe der synthetischen MHC-Klasse II-Peptide RT1.B2 und RT1.D2 und Cyclosporin A die Transplantatabstoßung? Falls ja, sind in Tieren mit Transplantatlangzeitfunktion alloreaktive T-Lymphozyten nachzuweisen?

## 3 Material und Methoden

---

### 3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Ratten folgender Inzuchtstämme verwendet: **Wistar Furth** (WF, RT1<sup>u</sup>) und **Lewis** (LEW, RT1<sup>l</sup>); in Klammern sind Stammabkürzung und der MHC-Haplotyp angegeben. Die Wistar Furth-Tiere fungierten als Organspender; die Lewis-Ratten als Organempfänger.

Die Tiere wurden über Charles River, Sulzfeld, bezogen. Zum Zeitpunkt der Transplantation wogen sie zwischen 200 und 220 Gramm und waren zwei bis drei Monate alt.

Die Ratten wurden in der Experimentellen Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg paarweise in Macro-Ion®-Käfigen auf Sägemehleinstreu gehalten. Sie erhielten Altromin®-Pressfutter und Wasser ad libitum. Der Organ-Spender wurde 24 Stunden und der Organ-Empfänger 12 Stunden vor Operation nüchtern gesetzt, d. h. er erhielt nur noch Wasser. Nach der Transplantation befanden sich die Tiere in Lamina-Flow-Schränken (Scantainer®, Scanbur, Kogen, Dänemark) bei einer Haltungstemperatur von 22±2°C und einer relativen Luftfeuchte von 50-60%. Der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug 12 Stunden. Der Kostaufbau post transplantationem erfolgte nach folgendem Schema: am OP-Tag: Wasser; am 1. postoperativen Tag: Wasser + 20% Glucose, am 2. postoperativen Tag: Wasser + Fresubin®; am dem 3. postoperativen Tag: Wasser + Altromin®-Pressfutter in Pelletform.

### 3.2 Transplantation

#### 3.2.1 Technische Hilfsmittel

Zur mikrochirurgischen Operation wurden Operationsmikroskope (Typ Mentor C, Wild M650, Leica, Codman, Herbruggen, Schweiz) mit 10- bis 25-facher

Vergrößerung verwendet. Es wurde in Isoflurannarkose (Abbott, Wiesbaden) unter aseptischen, nicht sterilen Bedingungen operiert.

### 3.2.2 Dünndarmtransplantation

Die orthotope Dünndarmtransplantation erfolgte nach dem von Deltz und Thiede beschriebenen Modell in modifizierter Form (Deltz E und Thiede A, 1985): Es wurden Jejunum und Ileum vom Treitzschen Band bis 1 cm vor der Ileocoecalklappe zusammen mit Mesenterium, mesenterialen Lymphknoten, Arteria mesenterica und Aortenmanschette orthotop transplantiert.

### 3.3 MHC-Klasse II-spezifische Allopeptide

Für die Versuche wurden synthetische Peptide verwendet, die den Aminosäuresequenzen der hypervariablen Regionen der  $\beta$ -Ketten von RT1.D<sup>u</sup>- und RT1.B<sup>u</sup> der als Spender dienenden Wistar Furth-Ratte entsprechen. Allgemein ist das RT1.D<sup>u</sup>-Kompartiment dem humanen MHC-Kompartiment DR gleichzusetzen, das RT1.B<sup>u</sup>-Kompartiment dem humanen Kompartiment DQ (Sayegh MH und Krensky AM, 1996). Bei dieser Arbeit wurden Peptide verwendet, die den Aminosäurepositionen 20 bis 44 der jeweiligen  $\beta$ -Kette entsprechen, im Folgenden kurz RT1.D2 und RT1.B2 genannt. RT1.D2 und RT1.B2 unterscheiden sich an 6 Aminosäurepositionen (Position 24, 26, 28, 30, 38, 40), welche sich vor allem am N-terminalen Ende (Positionen 22 – 30) befinden.

**Tabelle 3.1 (Seite 10): Darstellung der Aminosäuresequenzen der synthetisch hergestellten MHC-Klasse II-Peptide für den Haplotyp RT1<sup>u</sup> („WF-Peptide“) im Vergleich zu den entsprechenden Aminosäurepositionen 20 bis 44 der  $\beta$ -Kette der RT1.DR (RT1.D $\beta^l$ ) und RT1.DQ (RT1.B $\beta^l$ ) Sequenz des RT1<sup>l</sup>-Haplotyps von LEW.** Die Aminosäuresequenz ist im Ein-Buchstaben-Code vom aminoterminalen (N) zum carboxyterminalen (C) Ende aufgeführt. Rot dargestellt sind die Unterschiede zwischen RT1.D2 und RT1.B2. Blau repräsentiert die Unterschiede zwischen RT1.D $\beta^l$  und RT1.D2; Grün den Unterschied zwischen RT1.B $\beta^l$  und RT1.B2. X = unbekannte Aminosäure

Peptidbezeichnung	Aminosäuresequenz
RT1.D2	<b>N</b> - GTQR <b>VRL</b> <b>LAR</b> LIYNREEY <b>AR</b> FDS <b>DV</b> - <b>C</b>
RT1.B2	<b>N</b> - GTQR <b>IR</b> <b>NLI</b> <b>RY</b> IYNREEY <b>LR</b> YDS <b>DV</b> - <b>C</b>
RT1.Dβ <sup>l</sup>	<b>N</b> - XXXRVRL LAR <b>Y</b> IYNREEY <b>T</b> RFDS <b>DV</b> - <b>C</b>
RT1.Bβ <sup>l</sup>	<b>N</b> - XXXR I RNLI RYIYN <b>Q</b> EEY LRYDS <b>DV</b> - <b>C</b>

Vergleicht man die Sequenzen der synthetischen WF-Peptide mit denen der als Empfänger dienenden LEW-Ratte (RT1<sup>l</sup>), so finden sich zwei Unterschiede zwischen RT1.D2 und der entsprechenden Sequenz an den Positionen 20 – 44 der β-Kette von RT1.D<sup>l</sup>. Zum Einen ist an Position 30 Leucin durch Tyrosin ersetzt; zum Anderen befindet sich an Position 38 Threonin statt Alanin. Betrachtet man die Aminosäuresequenz 20 – 44 der β-Kette des RT1.B, so unterscheiden sich Wistar Furth und Lewis hier nur in einer Aminosäure: an Position 34 besitzt RT1. Bβ<sup>l</sup> Glutamin statt Arginin.

Die MHC-Klasse II-Allopeptide RT1.D2 und RT1.B2 wurden von MWG Biotech in Ebersberg synthetisiert. Der Reinheitsgrad von über 95% wurde durch RP-HPLC getestet; die Masse durch MALDI Massenspektrometrie bestimmt. Zur Immunisierung wurden die Peptide in sterilem PBS-Puffer (phosphate buffered saline: 140 mM NaCl, 2,7mM KCl, 7,2 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2) gelöst und auf eine Konzentration von 1mg/ml eingestellt.

### 3.4 Immunisierung

Die Sensibilisierung naiver LEW-Ratten erfolgte durch subkutane Injektion einer TiterMax<sup>®</sup>-Emulsion (Sigma, Taufkirchen) – TiterMax : Peptidlösung = 1:1 – in beide Hinterpfoten. Dabei erhielt jedes Tier pro Pfote 50 µg eines der MHC-Allopeptide. Die Immunisierung wurde jeweils sieben Tage vor Entnahme der

stimulierten Lymphknoten beziehungsweise vor Transplantation durchgeführt. Transplantierte Tiere erhielten intraoperativ nochmals einen Peptid-Booster von insgesamt 100 µg.

### **3.5 Immunsuppression**

Zur Immunsuppression wurde Cyclosporin A oder – kurz – CsA (Sandimmun<sup>®</sup>, Novartis, Nürnberg) verwendet. Es zählt zu den Calcineurin-Inhibitoren und wirkt selektiv auf Lymphozyten, insbesondere T-Zellen. Seine immunsuppressive Wirkung beruht vor allem auf der Hemmung der Interleukin-1-Freisetzung aus Makrophagen und der Synthesehemmung von Interleukin-2 in T-Helferzellen. Es hat keinen Effekt auf die Aktivierung von T-Suppressorzellen. Auch die indirekte Allo-Antigenerkennung bleibt von CsA unbeeinflusst (Hess AD et al., 1988).

### **3.6 Zellisolierung**

#### **3.6.1 Isolierung der T-Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten**

Milz und Lymphknoten wurden jeweils durch ein Sieb gedrückt und die Zellen in Kompletmedium (RPMI 1640 Medium) aufgefangen. Dieses enthielt 10 %iges fötales Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin,  $2 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol, 5 mM HEPES, 1% nicht-essentielle Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat (alles: Life Technologies GmbH, Karlsruhe). Die Zellen wurden bei 402 xg für 5 Minuten zentrifugiert (Sigma 4K10). Das gewonnene Zellpellet wurde wiederum in Kompletmedium resuspendiert und nochmals zentrifugiert; dieses Procedere wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 10fach verdünntem Lysepuffer resuspendiert, um die enthaltenen Erythrozyten zu eliminieren. Nach 3 Minuten wurde die Lyse durch Zugabe von Kompletmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde über Gaze (Hartenstein, Würzburg) filtriert und nochmals gewaschen. Abschließend wurden die Zellen gezählt.

### **3.6.2 Isolierung von Zellen aus peripherem Blut**

Die Blutentnahme erfolgte nach abgeschlossener Organentnahme aus der Vena cava inferior. Diese wurde mit einer 0,7 mm Kanüle punktiert und das Blut in eine heparinisierte Spritze aufgezogen, wobei dem Tier zur Aufrechterhaltung des Kreislaufs zwischendurch 0,9%ige NaCl-Lösung substituiert wurde. Pro Tier ließen sich ca. 15 ml Blut gewinnen. Dieses wurde 1:4 mit PBS verdünnt und zu Portionen à 10 ml auf 50 ml Röhrchen verteilt. Darauf wurden vorsichtig jeweils 10 ml Ficoll (Linaris, Biologische Produkte GmbH, Wertheim) geschichtet. Die so entstandenen Ficoll-Gradienten wurden anschließend bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 800 xg zentrifugiert (Sigma 4K10). Die gebildete Interphase wurde mit dem Sauger abgenommen und die Zellen in Kompletmedium resuspendiert. Nach der Lyse verbliebener Erythrozyten wurden die restlichen Zellen nochmals mit Kompletmedium gewaschen und gezählt.

### **3.6.3 Gewinnung Dendritischer Zellen**

Milzen naiver LEW-Ratten wurden durch ein steriles Stahlsieb gedrückt, die Zellen aufgefangen, zweimal gewaschen, lysiert, über Gaze filtriert und in Kompletmedium aufgenommen. Danach wurden sie in eine Zellkulturschale (Nunc, Wiesbaden) überführt und im Brutschrank (NUAIRE™ TS Inkubator) bei 37°C und 6 %-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach einer Stunde wurde der Überstand verworfen. Die plastikadhärenten Zellen wurden erneut in Kompletmedium resuspendiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand mit den diesmal in Suspension befindlichen dendritischen Zellen abgenommen und dreimal gewaschen. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen über 14,5 %-iges Metrizamid (Cedarline, London, Ontario, Canada) geschichtet und für 13 Minuten bei 1800 xg und 4°C zentrifugiert. Die Zellen der Interphase wurden aufgenommen, erneut gewaschen und gezählt. Die so gewonnene Population Dendritischer Zellen (DC) zeigt eine Reinheit von 50-60 %. (Otto et al., 2001). Abschließend wurden die Zellen mit einem Kobalt-β-Strahler für zehn Minuten mit 20 Gray bestrahlt, damit sie noch zur Antigen-Präsentation, nicht aber zur Zell-Proliferation fähig waren.

### 3.7 Versuchsgruppen

Die allogene Dünndarmtransplantation wurde in der Stammkombination Wistar Furth (WF) auf Lewis (LEW) durchgeführt. Zunächst wurde die Geschwindigkeit der Dünndarmtransplantat-Abstoßung ohne postoperative Immunsuppression untersucht (Gruppe I). In den weiteren Gruppen wurde der Einfluss der Immunsuppression auf die Transplantatfunktion untersucht: a) mit einer Hochdosis-Immunsuppression (15 mg/kg KG CsA) von Tag 0 bis 13 (Gruppe II) und b) mit einer verlängerten Immunsuppression (Gruppe III). Dabei wurde Cyclosporin A von Tag 0 bis 7 in einer Dosis von 5 mg/kg subkutan verabreicht; danach bis Tag 30 in einer Dosis von 1 mg/kg.

**Tabelle 3.2: Übersicht über die immunsuppressive Therapie nach Dünndarmtransplantation (DDTx) mit und ohne Peptidapplikation.** 0: keine Peptidapplikation; B; Applikation von RT1.B2; D: Applikation von RT1.D2; n: Anzahl der untersuchten Tiere.

<i>Gruppe</i>	<i>Immunsuppression (CsA)</i>		<i>n</i>
	<i>Konzentration</i>	<i>Dauer (Tage)</i>	
<b>I</b>	0		4
	B	---	4
	D		4
<b>II</b>	0		2
	B	15 mg/kg KG	0 - 13
	D		2
<b>III</b>	0		7
	B	5 mg/kg KG	0 - 7
	D	1mg /kg KG	8 - 30

Wie unter 3.4 beschrieben, wurden die Tiere der Gruppen B und D präoperativ mit synthetischen MHC-Klasse II-Allopeptiden behandelt. Die Peptid-Applikation erfolgte jeweils sieben Tage vor Transplantation. Am Tag der Operation erhielten diese Tiere eine erneute Peptid-Applikation zum „Boostern“. Tiere der Gruppen B erhielten das synthetische Peptid RT1.B2, Tiere der Gruppen D das Peptid RT1.D2.



## **3.8 Untersuchungen**

### **3.8.1 Makroskopisch-klinische Beurteilung**

Die transplantierten Ratten wurden täglich begutachtet. Die Beurteilung umfasste die Transplantatfunktion (Gewichtsabnahme, Stuhl, Beschaffenheit des Abdomens) und den Allgemeinzustand (Vigilanz, Körperhaltung, Fellbeschaffenheit). Bei einer Gewichtsabnahme von über 20% oder einem kontinuierlichen Verlust von mehr als 2% des Körpergewichts über einen Zeitraum von sechs Tagen wurde der Versuch aus Tierschutzgründen beendet.

### **3.8.2 Makroskopische Situsbeurteilung**

Zur Organentnahme wurde das Abdomen in Isoflurannarkose durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Das Dünndarmtransplantat mitsamt der mesenterialen Lymphknoten sowie Milz und Peritoneum des Empfängers wurden beurteilt. Beurteilungskriterien stellten beim Dünndarm die Durchblutung, die Beschaffenheit der Darmwand, der Grad der Verwachsung der Darmschlingen untereinander und mit der Umgebung, die Beschaffenheit der Peyer-Plaques sowie das Vorliegen von Bauchfelltranssudat (Aszites) dar. Die mesenterialen Lymphknoten wurden nach Größe und Grad der Fibrosierung beurteilt. Bei den Mesenterien richtete sich das Augenmerk auf Fibrosierung und Thrombosen. Die Milz wurde bezüglich ihrer Größe beurteilt.

### **3.8.3 Histologische Auswertung**

Das Transplantat wurde entnommen, in longitudinaler Schnittrichtung eröffnet und vom Inhalt befreit. Danach wurde es so aufgerollt, dass die Epithelschicht außen zu liegen kam. Zum Schluss wurde die Rolle mit einem monofilen Faden der Stärke 4-0 (Prolene<sup>®</sup>, Ethicon, Hamburg) gebunden, in 4 %-igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden Schnitte à 3µm Dicke angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (H.E.-Färbung).

Die Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop (BH 2<sup>®</sup>, Olympus) beurteilt. Dabei wurde auf Erhalt der Organstruktur, Gefäßveränderungen und Art, Ausmaß und Lokalisation von Zellinfiltraten geachtet. Die histologische Abstufung der Abstoßungsreaktion orientierte sich an den von Rosemurgy und Schraut (1986) definierten Phasen der akuten Abstoßung.

**Tabelle 3.3: Histologische Phasen der akuten Abstoßungsreaktion** (nach Rosemurgy AS und Schraut WH, 1986).

<i>Histologische Phasen der akuten Abstoßung</i>	
<b>0</b>	Keine Abstoßungsreaktion
<b>1</b>	Mononukleäres Zellinfiltrat in Mukosa und Submukosa, Epithel teilweise abgehoben, Kryptitis
<b>2</b>	Diffuseres Zellinfiltrat, Verplumpung der Zotten
<b>3</b>	Komplette Abflachung der Zotten, transmurales zelluläres Infiltrat

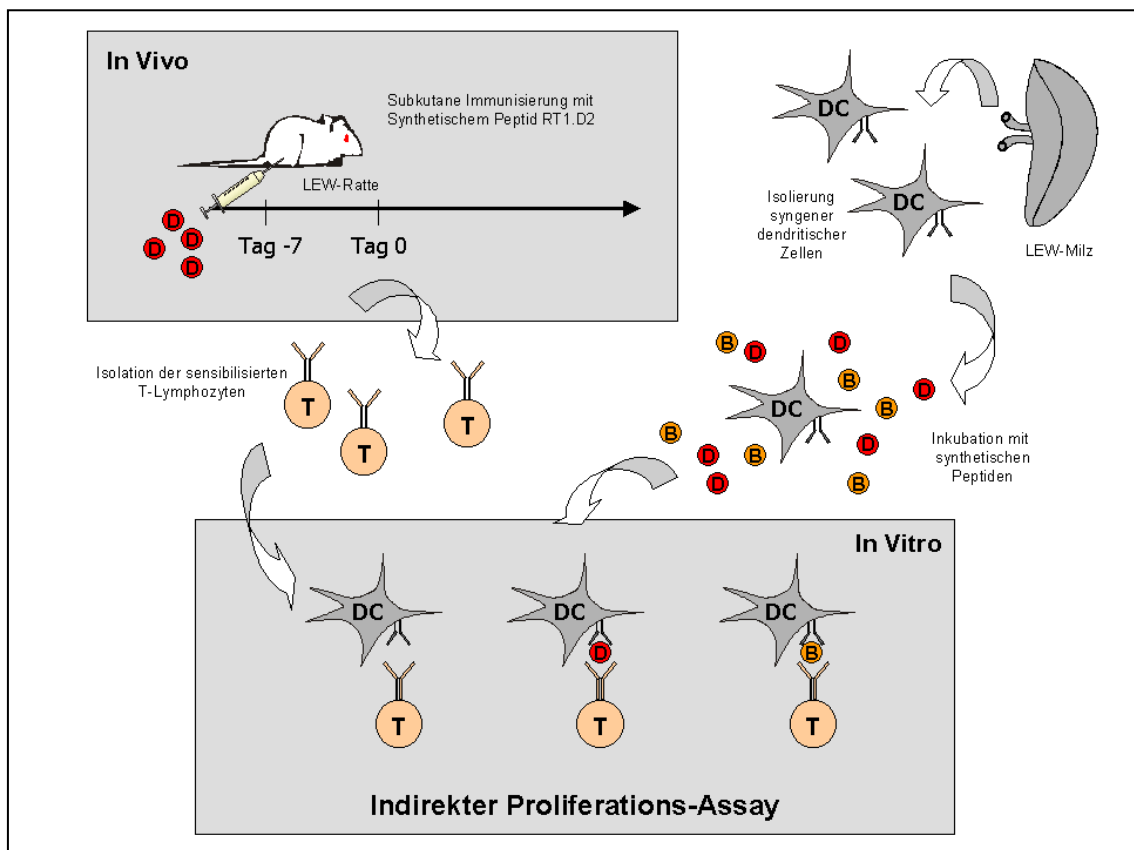
Andererseits wurde ein besonderes Augenmerk auf die Vaskulopathie in Submukosa und Subserosa gerichtet, welche kennzeichnend für die verzögert chronische Abstoßung ist (Langrehr JM et al., 1993). Sie äußert sich vor allem in Intimahyperplasie und Muskularishypertrophie. Außerdem wurde das vaskuläre und perivaskuläre Infiltrat beurteilt. Hierbei sind zwei pathologische Muster von Bedeutung: die Endothelialitis (Adhäsion mononukleärer Zellen an der Gefäßwand) und die Arteriitis (Mononukleäres Infiltrat der Arterienwand).

### **3.8.4 Indirekter T-Lymphozytenproliferations-Assay**

Dem indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay liegt das Prinzip der indirekten Allo-Antigenerkennung zugrunde. Hierbei erkennen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten mittels T-Zellrezeptor Peptid-Antigene, die von MHC-Klasse-II-Rezeptoren antigenpräsentierender Zellen dargeboten werden. Mit dem sogenannten T-Zell-Proliferationsassay lässt sich die Stärke der über den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung induzierten T-Zell-Proliferation messen. Hierbei wird sich die besondere Eigenschaft der MHC-Klasse-II-Mole-

küle zunutze gemacht, diese auch von außen mit synthetischen Peptiden beladen zu können.

Damit der indirekte T-Lymphozytenproliferations-Assay funktioniert, ist es notwendig, dass sich antigenaktivierte T-Lymphozyten in der zu testenden T-Zellpopulation befinden. Mit dem entsprechenden Peptid, das von autologen Dendritischen Zellen präsentiert wird, lassen sich diese aktivierten T-Lymphozyten *in vitro* restimulieren. Dieser Assay ist streng antigenspezifisch und beruht auf dem immunologischen "Gedächtnis" der T-Lymphozyten; "naive" T-Lymphozyten werden in diesem Assay nicht aktiviert. In dieser Arbeit wurden T-Lymphozyten aus poplitealen Lymphknoten immunisierter Tiere (Entnahmezeitpunkt: Tag 7 nach Immunisierung) beziehungsweise aus Milz und Blut Dünndarm-transplantierten Ratten, welche nach dem immunsuppressiven Schema der Gruppe III behandelt wurden, verwendet (Entnahmezeitpunkt: Tag 20 bzw. Tag 40 nach Transplantation). Sie wurden mit autologen Dendritischen Zellen kultiviert, die zuvor mit RT1.B2 bzw. RT1.D2 inkubiert wurden.



**Abbildung 3.1 (Seite 16): Schematische Darstellung des indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assays.** Weitere Erläuterungen sind im Text zu finden.

Der T-Zell-Proliferationsassay wurde in Zellkultur-Mikroplatten mit 96 Rundboden-Vertiefungen von Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland, durchgeführt. Jede Vertiefung enthielt  $1 \times 10^5$  T-Lymphozyten und  $1 \times 10^4$  bestrahlte Dendritische Zellen sowie  $10 \mu\text{g}$  eines der beiden Peptide (RT1.B2 oder RT1.D2) in einem Gesamtvolumen von  $150 \mu\text{l}$  Kompletmedium. Hierzu wurden zunächst die Dendritischen Zellen mit einem der beiden Peptide für eine Stunde inkubiert und danach die T-Lymphozyten hinzugegeben. Des Weiteren wurden folgende Kontrollen angesetzt: T-Lymphozyten solo; T-Lymphozyten mit Peptid; T-Lymphozyten und Dendritische Zellen; Dendritische Zellen solo; Dendritische Zellen mit Peptid; Medium und mit Concanavalin A ( $2 \mu\text{l/ml}$ ; Sigma, Taufkirchen) stimulierte T-Lymphozyten als Positivkontrolle. Die Kulturplatten wurden für 3 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%-iger  $\text{CO}_2$ -Sättigung kultiviert. Während der letzten 6 Stunden wurden die Zellen mit  $0,5 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin je Vertiefung inkubiert ("gepulst"). Der [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Einbau wurde mit einem "β-plate"-Szintillationsmeßgerät bestimmt (Institut für Virologie und Immunbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg). Jedes Experiment wurde in sechs Parallelansätzen durchgeführt und die Ergebnisse als Durchschnittswerte in „Impulsen pro Minute“ (counts per minute oder cpm) angegeben.

### **3.9 Statistische Auswertung**

Die Daten wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation 1985-2003) statistisch ausgewertet. Die Werte zur Proliferation von T-Lymphozyten (Abb. 4.1 - 4.5) sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die Transplantatfunktionszeiten (Abb. 4.6, 4.7 und 6.1) in Tagen sind als Boxplot (auch als Kastengrafik bezeichnet) dargestellt. Die Fünf-Punkte-Werte sind: Median, unteres und oberes Quartil sowie Minimal- und Maximalwert.

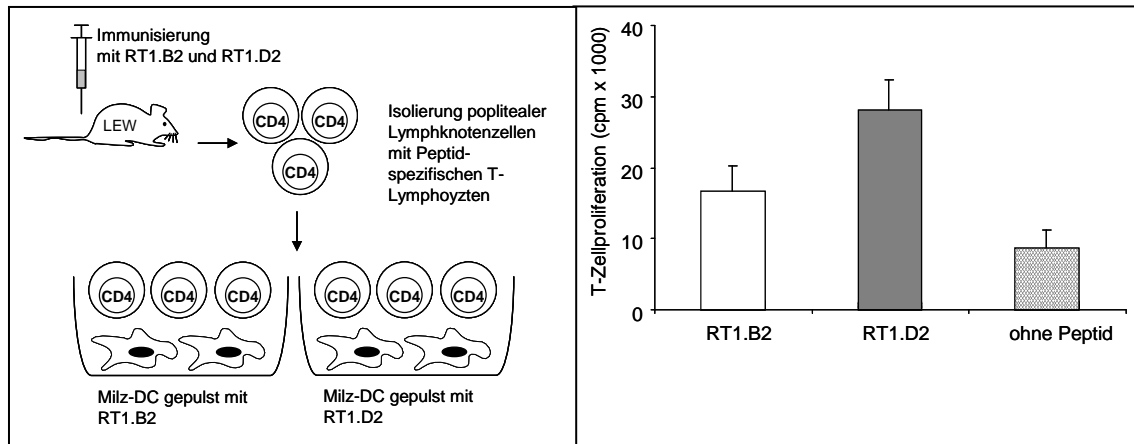
## 4 Ergebnisse

---

Wesentliche Ursache der Transplantatabstoßung sind genetisch bedingte Unterschiede in den Molekülen des MHC-Komplexes zwischen Spender und Empfänger (s. auch Einleitung). In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der *indirekten Allo-Antigenerkennung* zur Auslösung, aber auch zur Hemmung der Transplantatabstoßung untersucht. Hierzu wurden die beiden synthetischen Allopeptide RT1.B2 und RT1.D2 hinsichtlich ihrer Fähigkeit, antigenspezifische T-Lymphozyten *in vivo* zu aktivieren, untersucht. Beide Peptide repräsentieren einen bestimmten Bereich der  $\beta$ -Kette des MHC-Klasse-II-Moleküls der Wistar Furth-Ratte (s. auch Einleitung bzw. Material und Methoden). Für die Transplantationsexperimente sind Wistar Furth-Ratten die Transplantatspender, weshalb diese beiden Allopeptide für das Immunsystem von Lewis-Ratten, den Transplantatempfängern, spenderspezifische Antigene darstellen.

### 4.1 Indirekter T-Lymphozytenproliferations-Assay zum Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten

Um zu untersuchen, ob die beiden Allopeptide RT1.B2 und RT1.D2 T-Lymphozyten *in vivo* aktivieren, wurden sie gemischt und subkutan in die Hinterpfoten von Lewis-Ratten injiziert (Abb. 4.1). Klinisch unterschieden sich die Tiere nicht von unbehandelten („naiven“) Lewis-Ratten, jedoch waren sieben Tage nach Peptid-Applikation die poplitealen Lymphknoten im Vergleich zu den poplitealen Lymphknoten naiver Tiere deutlich vergrößert – ein erster Hinweis auf eine Immunreaktion. Ob dieses Phänomen auf eine Aktivierung von T-Lymphozyten zurückzuführen ist, wurde im *indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay* analysiert. Dieses Detektionssystem basiert darauf, dass T-Lymphozyten bei einem Zweitkontakt mit dem Antigen erneut proliferieren. Zur Restimulierung wurden autologe Dendritische Zellen mit den beiden Allopeptiden RT1.B2 bzw. RT1.D2 beladen (Abb. 4.1).

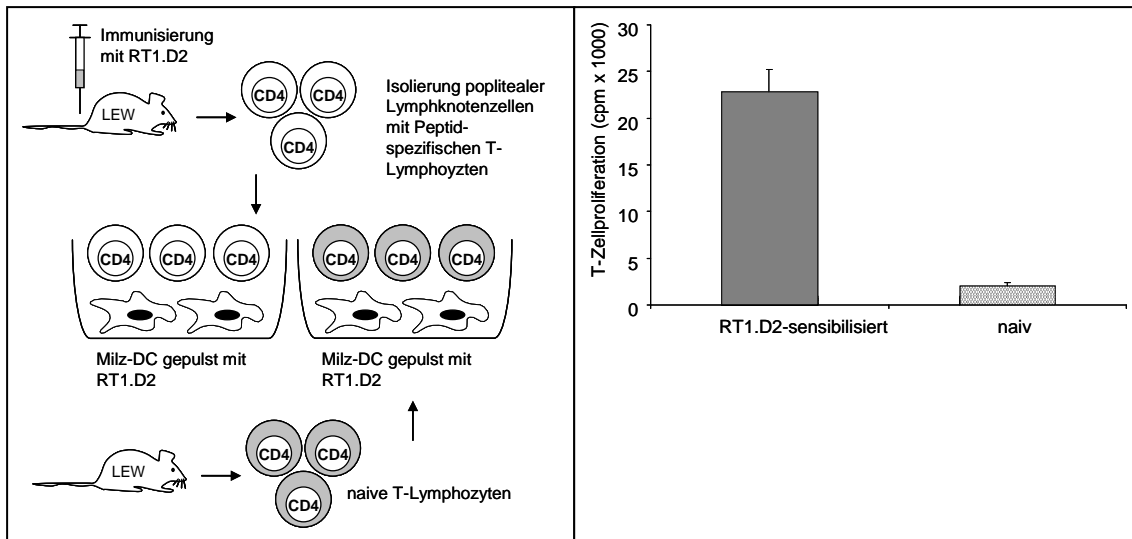


**Abb. 4.1: Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro*: Vergleich der beiden Allopeptide RT1.B2 und RT1.D2.** Lewis-Ratten wurden mit einem Gemisch der Peptide RT1.B2 und RT1.D2 im Verhältnis 1:1 immunisiert. Nach sieben Tagen wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen, die Lymphozyten isoliert und mit Peptid RT1.D2 bzw. RT1.B2 im Proliferationsassay restimuliert. Die Proliferation der *in vitro* restimulierten T-Lymphozyten ist als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus wenigstens 6 Parallelwerten im Proliferationsassay gezeigt. Die Daten basieren auf jeweils 3 Immunisierungen.

Die Proliferation der aus den poplitealen Lymphknoten isolierten antigenspezifischen T-Lymphozyten war im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Peptid erhöht (Abb. 4.1). Dabei proliferierten die T-Lymphozyten in Gegenwart von RT1.D2 deutlich stärker als mit Peptid RT1.B2:  $28.065 \pm 4.323$  cpm vs.  $16.745 \pm 3.528$  cpm. Die Stärke der T-Zellproliferation im Kontrollansatz betrug  $8.679 \pm 2.633$  cpm. Beide synthetischen Allopeptide sind somit in der Lage, antigenspezifische T-Lymphozyten *in vivo* zu induzieren. Da Peptid RT1.D2 eine stärkere T-Zell-Antwort auslöst als Peptid RT1.B2, wird es als immundominantes Peptid bezeichnet.

Im indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay sollen ausschließlich antigenspezifische T-Lymphozyten über ihre Proliferation nachgewiesen werden. Diese Zellen, die bereits *in vivo* mit dem entsprechenden Allopeptid Kontakt hatten, lassen sich *in vitro* mit diesem Peptid restimulieren. Im Gegensatz dazu sollten naive T-Lymphozyten nicht aktiviert werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Proliferation naiver T-Lymphozyten, die aus den poplitealen Lymphknoten nicht-immunisierter Tiere isoliert wurden, mit der Proliferation RT1.D2-aktivierter T-

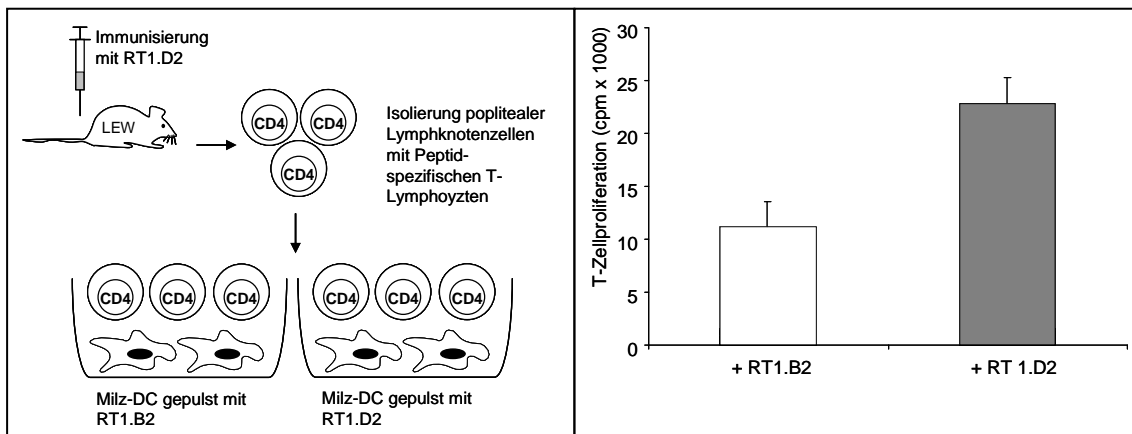
Lymphozyten verglichen. Hierzu enthielten beide Ansätze RT1.D2-gepulste autologe Dendritische Zellen (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro*: Vergleich zwischen antigenspezifischen und naiven T-Lymphozyten.** Lewis-Ratten wurden mit dem Peptid RT1.D2 immunisiert und nach sieben Tagen die aus den poplitealen Lymphknoten isolierten Lymphozyten *in vitro* mit RT1.D2 restimuliert. Als Kontrolle wurden naive T-Lymphozyten verwendet, die aus nicht-immunisierten Tieren isoliert wurden. Nur T-Lymphozyten, die zuvor *in vivo* mit dem immunogenen Allopeptid RT1.D2 sensibilisiert wurden (für RT1.B2 nicht gezeigt), proliferierten im indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay. Nur sie ließen sich restimulieren, nicht aber naive T-Lymphozyten. Die Proliferation ist als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus wenigstens 6 Parallelwerten im Proliferationsassay gezeigt. Die Daten basieren auf jeweils 3 Immunisierungen.

Die Auswertung des indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assays zeigte, dass nur zuvor *in vivo* aktivierte T-Lymphozyten bei erneutem Antigenkontakt proliferierten (Abb. 4.2): Die Proliferation der RT1.D2-aktivierten T-Lymphozyten war mit  $22.790 \pm 2.466$  cpm zwar etwas niedriger als für die in Abb. 4.1 gezeigte Versuchsserie, aber doch eindeutig. Die naiven T-Lymphozyten proliferierten nicht ( $2.019 \pm 376$  cpm). Somit werden unter den gegebenen Bedingungen des *in vitro* Assays ausschließlich *in vivo* aktivierte T-Lymphozyten reaktiviert. Dagegen blieb eine Aktivierung naiver Zellen aus.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob zur Reaktivierung Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro* das Allopeptid erforderlich ist, mit dem die T-Lymphozyten *in vivo* aktiviert wurden, oder ob die Reaktivierung auch mit anderen Allopeptiden möglich ist. Hierzu wurden mit RT1.D2-sensibilisierte T-Lymphozyten mit RT1.D2 oder mit RT1.B2-gepulsten Dendritischen Zellen inkubiert (Abb. 4.3).



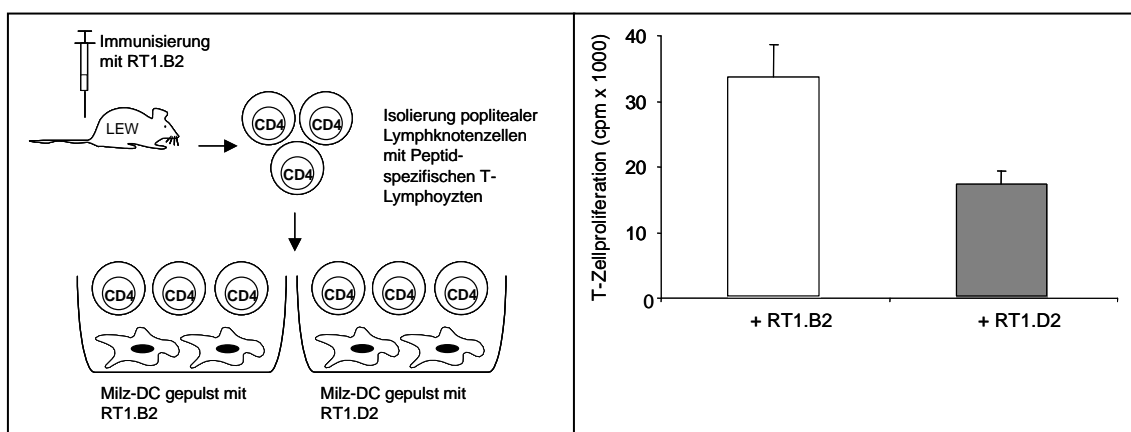
**Abb. 4.3: Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro*: Bedeutung des Peptidantigens für die Restimulation Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten.** Lewis-Ratten wurden mit dem Peptid RT1.D2 immunisiert und nach sieben Tagen die aus den poplitealen Lymphknoten isolierten Lymphozyten *in vitro* mit RT1.D2 bzw. RT1.B2 restimuliert. RT1.D2-spezifische T-Lymphozyten wurden durch RT1.D2-beladene Dendritische Zellen (DC) stärker restimuliert als durch RT1.B2-beladene Dendritische Zellen. Die Proliferation ist als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus wenigstens 6 Parallelwerten im Proliferationsassay gezeigt. Die Daten basieren auf jeweils 3 Immunisierungen.

Abbildung 4.3 zeigt, dass sich Allopeptid-spezifische T-Lymphozyten am effektivsten mit dem Allopeptid restimulieren lassen, mit dem auch immunisiert wurde. So zeigten **RT1.D2**-spezifische T-Lymphozyten *in vitro* eine stärkere Proliferation in Gegenwart von Peptid RT1.D2 als von RT1.B2 ( $22.790 \pm 2.466$  cpm vs.  $11.217 \pm 2.330$  cpm). Dabei proliferierten die RT1.D2-spezifischen T-Lymphozyten in Gegenwart von Peptid RT1.B2 nur gering. Diese lag um ca. 30 % über dem Kontrollansatz ohne Peptid ( $8.698 \pm 2.118$  cpm; nicht gezeigt).



Umgekehrt wurden **RT1.B2**-spezifische T-Lymphozyten *in vitro* am effektivsten mit dem weniger immunogenen Peptid RT1.B2 restimuliert. Die Proliferation von  $33.619 \pm 4.889$  cpm in Gegenwart von RT1.B2 war im Gegensatz zu Peptid RT1.D2 ( $17.245 \pm 1.958$  cpm) deutlich um 172 % erhöht. Im Vergleich zur Proliferation im Kontrollansatz ohne Peptid ( $12.369 \pm 870$  cpm), war die Proliferation RT1.B2-spezifischer T-Lymphozyten in Gegenwart von RT1.D2 leicht um 39 % erhöht.

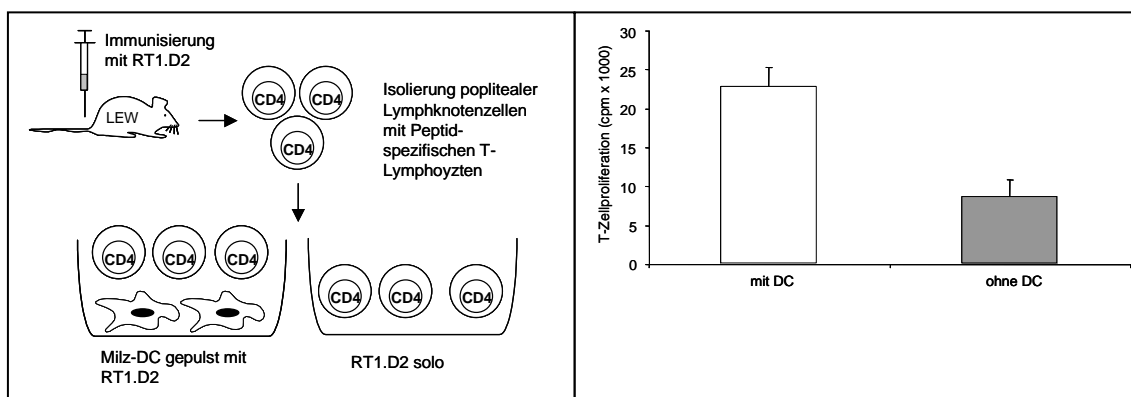
Des Weiteren ist zur Reaktivierung Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro* das Allopeptid erforderlich, dass auch zur Immunisierung verwendet wurde (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4: Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro*: Bedeutung des Peptidantigens für die Restimulation Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten.** Lewis-Ratten wurden mit dem Peptid RT1.B2 immunisiert und nach sieben Tagen die aus den poplitealen Lymphknoten isolierten Lymphozyten *in vitro* mit RT1.D2 bzw. RT1.B2 restimuliert. RT1.B2-spezifische T-Lymphozyten wurden durch RT1.B2-beladene Dendritische Zellen stärker restimuliert als durch RT1.D2-beladene Dendritische Zellen. Dabei ist die durch Peptid RT1.D2 ausgelöste Proliferation der RT1.B2-spezifischen T-Lymphozyten stärker als die von RT1.D2-spezifischen T-Lymphozyten in Gegenwart von Peptid RT1.B2 (Abb. 4.3). RT1.B2-spezifische T-Lymphozyten scheinen somit eine gewisse Kreuzreaktivität zum Peptid RT1.D2 zu zeigen. Die Proliferation ist als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus wenigstens 6 Parallelwerten im Proliferationsassay gezeigt. Die Daten basieren auf jeweils 3 Immunisierungen.

In den bisher vorgestellten Experimenten wurden autologe Dendritische Zellen mit dem jeweiligen Allopeptid beladen. In einer weiteren Versuchsserie wurde untersucht, ob zur Reaktivierung Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten das

„lösliche“ Allopeptid alleine ausreicht, oder ob mit Allopeptid beladene Dendritische Zellen notwendig sind.



**Abb. 4.5: Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro*: Die Notwendigkeit Allopeptid-beladener Dendritischer Zellen zur Restimulierung Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten.** Nur wenn die Allopeptid-spezifischen T-Lymphozyten (hier RT1.D2-spezifische T-Lymphozyten) mit RT1.D2-beladenen Dendritischen Zellen inkubiert wurden, war eine Restimulierung zu beobachten – ein Hinweis auf den indirekten Weg der Alloantigenerkennung (siehe Einleitung). RT1.D2-spezifische T-Lymphozyten, die in Abwesenheit Dendritischer Zellen mit RT1.D2 inkubiert wurden, proliferierten nicht (RT1.D2 solo). Die Proliferation ist als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus wenigstens 6 Parallelwerten im Proliferationsassay gezeigt. Die Daten basieren auf jeweils 3 Immunisierungen.

Hierzu wurden RT1.D2-spezifische T-Lymphozyten mit löslichem, d.h. mit nicht an Dendritischen Zellen gebundenem, RT1.D2-Peptid bzw. mit Allopeptid-beladenen Dendritischen Zellen restimuliert (Abb. 4.5). Ausschließlich in den Ansätzen, in denen sich auch beladene Dendritische Zellen befanden, war eine deutliche Proliferation restimulierter T-Lymphozyten zu beobachten ( $22.790 \pm 2.466$  cpm). Im Gegensatz dazu war kein Unterschied festzustellen, ob die aktivierten T-Lymphozyten mit bzw. ohne RT1.D2 kultiviert wurden ( $8.698 \pm 2.118$  cpm vs.  $7.822 \pm 1.669$  cpm). Die Anwesenheit autologer Dendritischer Zellen, die die Allopeptide in ihren MHC-Klasse-II-Rezeptoren präsentieren, stellt somit eine wesentliche Voraussetzung für die Restimulierung antigenspezifischer T-Lymphozyten dar. Nur dann ist eine Proliferation Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro* zu messen.

### **Zusammenfassung von Kapitel 4.1:**

1. Die beiden Allopeptide RT1.B2 und RT1.D2 sind immunogen; das heißt, sie aktivieren *in vivo* antigenspezifische T-Lymphozyten. Das Peptid RT1.D2 ist im Vergleich zum Peptid RT1.B2 das immundominante Peptid.
2. Nur T-Lymphozyten, die auch *in vivo* mit Allopeptid aktiviert (immunisiert) wurden, sind im indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay restimulierbar und damit nachweisbar. Für diese Restimulierung ist das Allopeptid notwendig, das auch zur Immunisierung verwendet wurde.
3. Zur Restimulierung Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten sind autologe Dendritische Zellen notwendig, die mit Allopeptid beladen werden.

## **4.2 Allopeptid-induzierte Effekte nach Organtransplantation**

Nachdem gezeigt wurde, dass die hier verwendeten Allopeptide antigenspezifische T-Lymphozyten *in vivo* induzieren, wurde untersucht, welche Wirkung sie auf ein Organtransplantat haben. In den Transplantationsexperimenten waren Wistar Furth-Ratten die Transplantatspender und Lewis-Ratten die Transplantatempfänger. Die hier verwendeten Allopeptide stammen aus Bereichen des MHC-Klasse-II-Moleküls der Wistar Furth-Ratte und stellen somit spenderspezifische Antigene für das Immunsystem der Lewis-Ratte dar. Deshalb wurde vermutet, dass mit Allopeptiden immunisierte Lewis-Ratten ihre Transplantate schneller zerstören als nicht-immunisierte Tiere.

Die Transplantationsexperimente wurden mit dem sehr immunogenen Dünndarm durchgeführt. Hierzu wurde der Dünndarm in orthotoper Position transplantiert (s. auch Material und Methoden). Der Effekt der beiden Allopeptide RT1.B2 und RT1.D2 auf die akute Abstoßung wurde untersucht (Abschnitt 4.2.1). Hierzu wurden keine Immunsuppressiva verwendet. Als weiteres wurde untersucht, ob die Allopeptid-induzierte akute Abstoßung durch eine kurzfristige Immunsuppression mit hoch dosiertem Cyclosporin A zu verhindern ist (Abschnitt 4.2.2). Da CsA in hohen Dosen die Antigenpräsentierung hemmt

(Hess et al., 1988), die für die indirekte Alloantigenerkennung notwendig ist, wurde ebenfalls untersucht, ob eine niedrig dosierte Immunsuppression mit CsA, die über einen längeren Zeitraum verabreicht wurde als die hoch dosierte Immunsuppression, die verzögerte Abstoßung beeinflusst (Abschnitt 4.2.3).

#### 4.2.1 Allopeptid-induzierte Effekte ohne Immunsuppression

In einer ersten Versuchsreihe erfolgte die orthotope Dünndarmtransplantation in der Stammkombination WF→LEW. Die Tiere der Gruppen I.B und I.D wurden sieben Tage vor der Operation und am Tag der Operation mit jeweils 50 µg Peptid (RT1.B2 bzw. RT1.D2) immunisiert. Kontrolltiere (Gruppe I.0) wurden nicht immunisiert. Sämtliche Transplantate wurden, wie erwartet, akut abgestoßen, wobei die Immunisierung mit den beiden Allopeptiden die Abstoßung eindeutig beschleunigte (Tab. 4.1). Die Unterschiede der Gruppen I.B und I.D zur Kontrollgruppe I.0 sind signifikant ( $p = 0.004$  bzw.  $0.001$ ; Student's t-Test).

**Tabelle 4.1: Versuchsgruppe I: Dünndarmtransplantation ohne Immunsuppression.** Untersucht wurde die Wirkung der beiden Allopeptide RT1.B2 und RT1.D2 auf die Transplantatfunktion. Untergruppe I.0: Empfängertiere wurden nicht mit einem Allopeptid immunisiert; I.D: Empfängertiere wurden mit dem Allopeptid RT1.D2 immunisiert; I.B: Empfängertiere wurden mit dem Allopeptid RT1.B2 immunisiert.

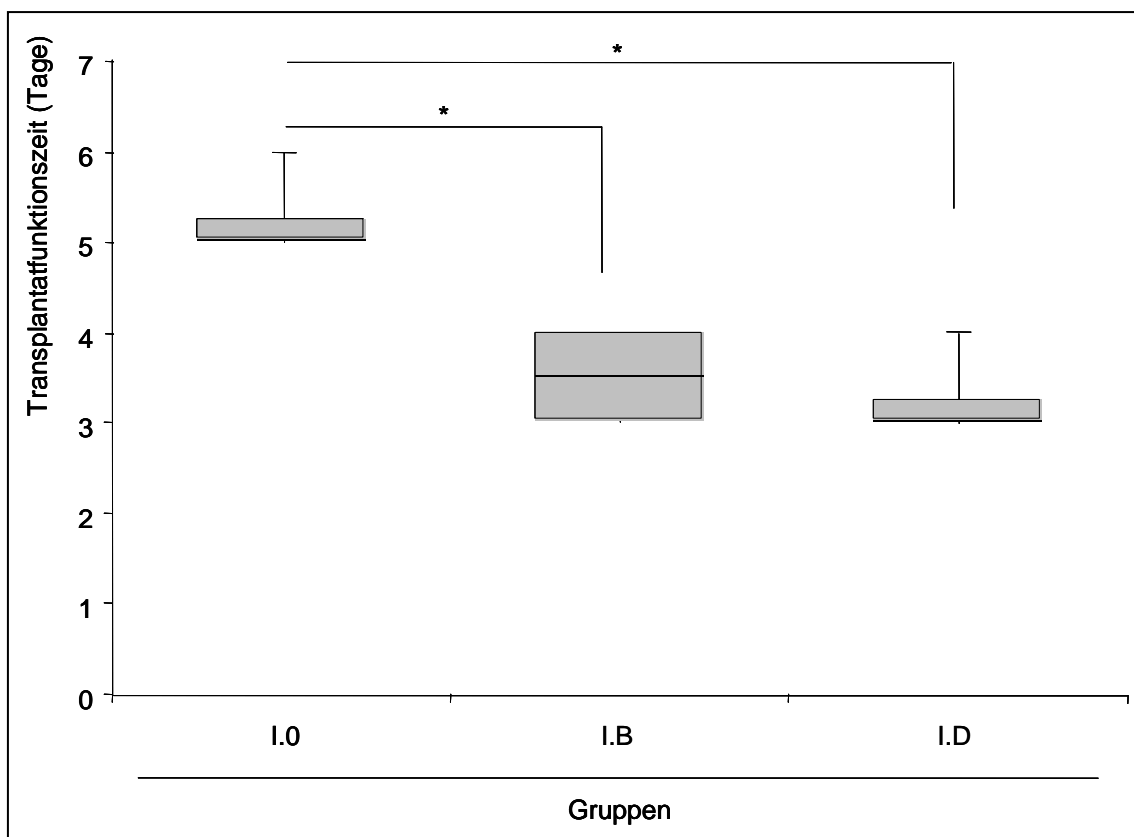
Gruppe	Peptid *)	N	Transplantatfunktion in Tagen **)	Mittelwert ± Stabw ***)
I.0	---	4	5, 5, 5, 6	5,3 ± 0,5
I.B	RT1.B2	4	3, 3, 4, 4	3,5 ± 0,6
I.D	RT1.D2	4	3, 3, 3, 4	3,3 ± 0,5

\*) Sieben Tage vor und zum Zeitpunkt der Dünndarmtransplantation wurden den Tieren jeweils 50 µg Peptid subkutan in die Fußsohle injiziert.

\*\*) Kriterium für den Zeitpunkt der Transplantatabstoßung war die Entwicklung anhaltender Diarrhoe mit rapidem Gewichtsverlust (s. hierzu auch Abschnitt 3.8.1) wobei sämtliche Tiere präterminal obduziert wurden. Zu diesem Zeitpunkt war die Funktion der Transplantate stark vermindert.

\*\*\*) Standardabweichung (Angabe in Tagen).

In nicht-immunisierten Empfängertieren verloren die Transplantate durchschnittlich nach fünf Tagen ( $5,3 \pm 0,5$  Tage) ihre Funktion. Die Immunisierung der Empfängertiere mit Peptid RT1.B2 und RT1.D2 führte zu einer beschleunigten Abstoßung von  $3,5 \pm 0,6$  Tage bzw.  $3,3 \pm 0,5$  Tage (Tab. 4.1). Histologisch wiesen alle Transplantate das Bild einer akuten Abstoßungsreaktion auf: Die Zotten erschienen ödematös verdickt und ihre Spitzen waren abgeschilfert. Die Krypten waren infiltriert, teilweise herrschte ein transmurales Infiltrat vor (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.6: Graphische Darstellung der Transplantatfunktionszeiten für die Versuchsgruppe I.** Die Immunisierung mit den Allopeptiden RT1.B2 und RT1.D2 verkürzt die Transplantatfunktionszeiten signifikant (\*). Für weitere Informationen siehe Text und Tab. 4.4.

## 4.2.2 Allopeptid-induzierte Effekte unter hoch dosierter Immunsuppression

### *Transplantatfunktion nach orthotoper Dünndarmtransplantation*

Ohne Immunsuppression führte die Applikation von Allopeptiden sieben Tage vor und zum Zeitpunkt der Dünndarmtransplantation zur beschleunigten Transplantatabstoßung. In einem nächsten Schritt wurde versucht, die Transplantatfunktion mit einer zeitlich begrenzten Immunsuppression zu verlängern. Hierzu wurden die Tiere mit Cyclosporin A in einer Dosis von 15 mg/kg KG von Tag 0 bis 13 behandelt, welches intramuskulär verabreicht wurde. Die Peptidapplikation erfolgte wiederum wie in Material und Methoden beschrieben.

**Tabelle 4.2: Versuchsgruppe II: Dünndarmtransplantation mit hoch dosierter Immunsuppression von 15 mg/kg KG CsA von Tag 0-13.** Untergruppe II.0: Empfängertiere wurden nicht mit Allopeptid immunisiert; Untergruppe II.D: Empfängertiere wurden mit Allopeptid RT1.D2 immunisiert; Untergruppe II.B: Empfängertiere wurden mit Allopeptid RT1.B2 immunisiert.

Gruppe	Peptid *)	N	Transplantatfunktion in Tagen **)	Mittelwert $\pm$ Stabw ***)
II.0	---	2	74, 122	88 $\pm$ 19,8
II.B	RT1.B2	4	43, 55, 57****)	51,7 $\pm$ 7,6
II.D	RT1.D2	2	36, 56	46 $\pm$ 14,1

\*) Peptidapplikation sieben Tage vor und während der Dünndarmtransplantation (Tag -7/0).

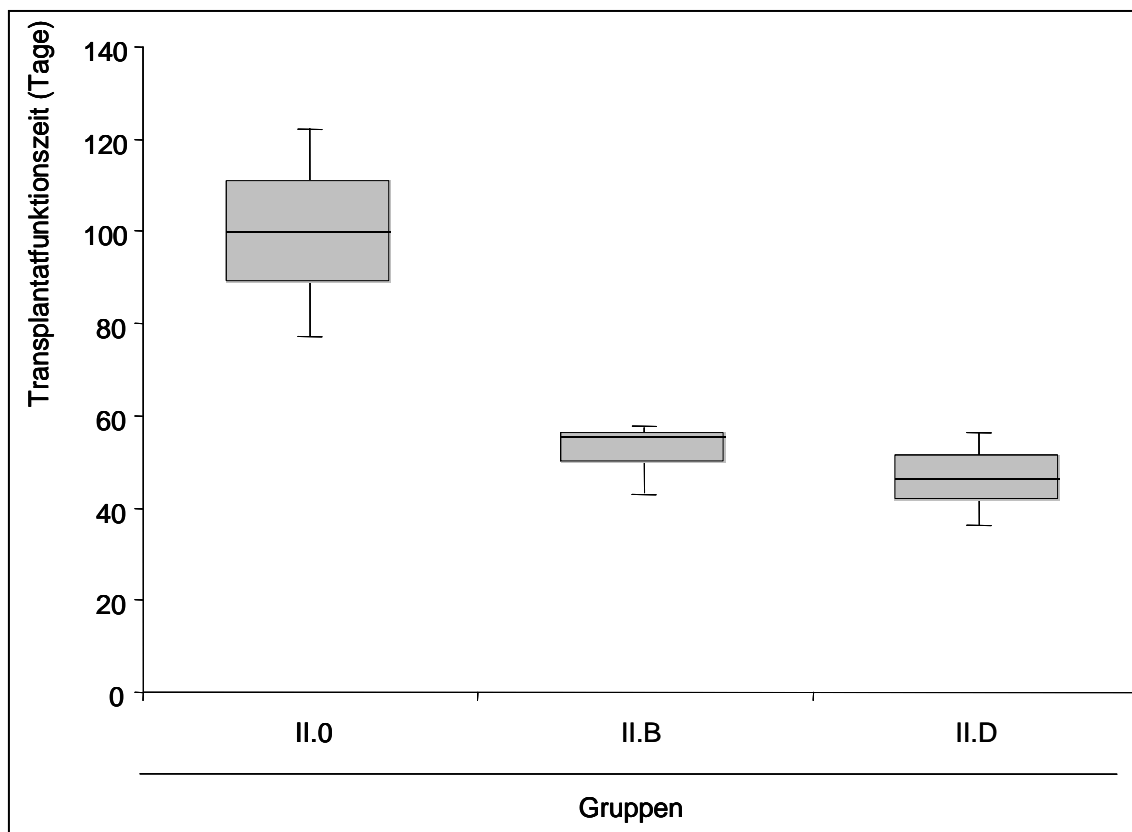
\*\*) Kriterium für die Obduktion war ein anhaltender Gewichtsverlust >2% über  $\geq$  6 Tage, sowie eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit Rötung von Nase und Ohren, struppigem Fell, abdomineller Verhärtung bzw. Schwellung und ggf. Aszites.

\*\*\*) Standardabweichung (Angabe in Tagen).

\*\*\*\*) Ein mit RT1.B2 immunisiertes Tier zeigte am Tag 64 noch keine klinische Abstoßungsreaktion. Es wurde aber als Kontrolle obduziert, um über die Histologie Einblicke in die Transplantatfunktion zu gewinnen.

Die alleinige Immunsuppression mit CsA (Gruppe II.0, Tab. 4.2) verlängerte die Transplantatfunktion von  $5,3 \pm 0,5$  Tagen (Tab. 4.1) auf nahezu 90 Tagen ( $88 \pm 19,8$  Tage). Wurden die Tiere vor Transplantation mit Allopeptiden immunisiert, so war die Transplantatfunktionszeit deutlich verkürzt:  $46 \pm 14,1$  Tage für Transplantate der Gruppe II.D und  $51,7 \pm 7,6$  Tagen für Transplantate der

Gruppe II.B (Tab. 4.2). Aufgrund der geringen Gruppengröße waren die Unterschiede der Gruppen II.B und II.D zur Kontrollgruppe II.0 statistisch nicht signifikant ( $p= 0.09$  bzw.  $0,18$ ).



**Abb. 4.7: Graphische Darstellung der Transplantatfunktionszeiten für die Versuchsgruppe II.** Die Immunisierung mit den Allopeptiden RT1.B2 und RT1.D2 verkürzt die Transplantatfunktionszeiten auch nach einer Kurzzeit-Therapie mit hochdosiertem CsA. Für weitere Informationen siehe Text und Tab. 4.2.

Die präoperative Applikation der Allopeptide RT1.B2 und RT1.D2 führte somit auch unter einer kurzzeitigen Hochdosis-Immunsuppression zu einer beschleunigten Transplantatabstoßung. Dabei schien das immundominante Allopeptid RT1.D2 (Abschnitt 4.1) im Vergleich zum weniger immunogenen Allopeptid RT1.B2 die Abstoßung stärker zu beschleunigen. Die Gruppengrößen lassen jedoch keine statistisch gesicherten Aussagen zu. Was jedoch gesagt werden kann ist, dass auch unter einer kurzzeitigen Hochdosis-Immunsuppression Allopeptid-spezifische T-Lymphozyten die Transplantatabstoßung beschleunigen.

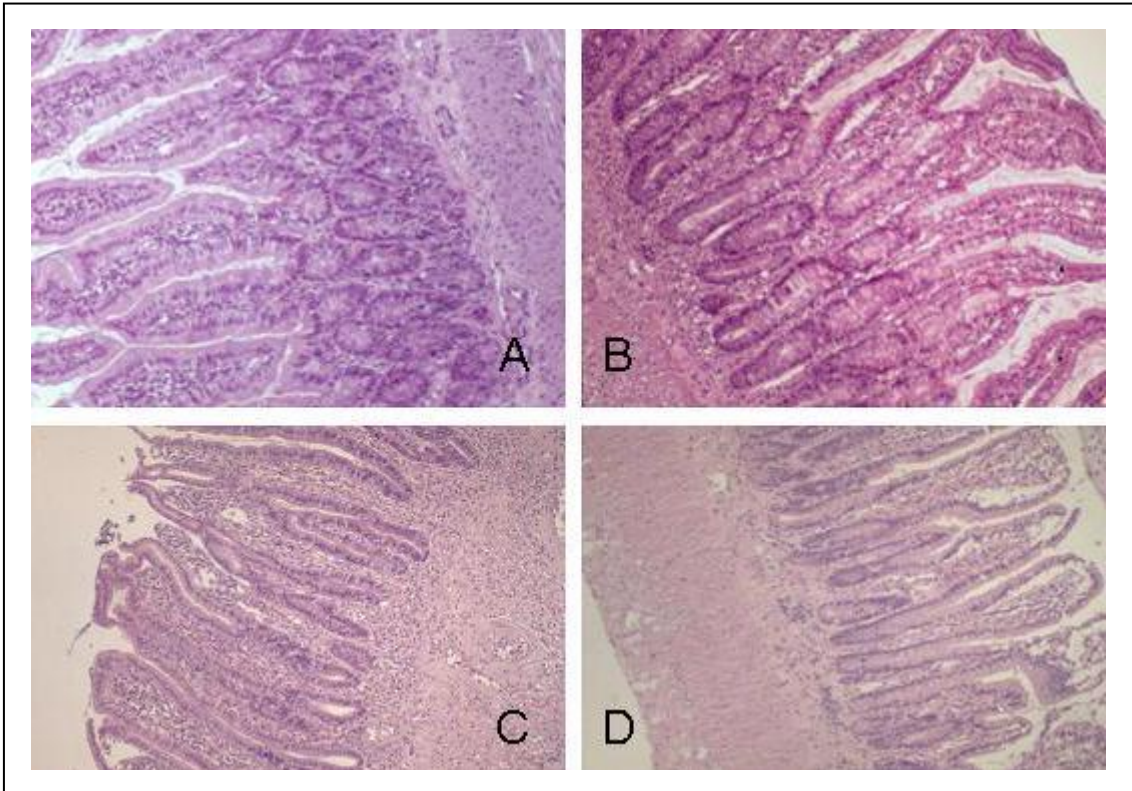
### ***Histologische Auswertung***

Die histologische Abstufung der Abstoßungsreaktion orientierte sich an den von Rosemurgy und Schraut definierten Phasen der akuten Abstoßung (siehe Material und Methoden). Des Weiteren wurde vor allem der Zustand der Gefäße beurteilt. Dabei wurden Vaskulopathien als Zeichen der chronischen Abstoßung gewertet, die bei diesen Transplantatfunktionszeiten bereits zu erwarten sind (Tab. 4.3).

Bei der überwiegenden Anzahl der Transplantate der Versuchsgruppe II (Tab. 4.3, Seite 31) wurden – unabhängig davon, ob die Tiere mit Allopeptiden immunisiert worden waren oder nicht – Merkmale akuter und chronischer Abstoßung nebeneinander vorgefunden, wobei die der akuten Abstoßung dominierten. Die meisten Tiere dieser Versuchsgruppe befanden sich in Phase 2 der akuten Abstoßung (Tab. 4.3). Die Zotten der Transplantate wirkten durch Abschilferung und ein Stromaödem plump. In der Kryptenregion war der Anteil der Becherzellen deutlich verringert. Die gesamte Mukosa und die Muskularis waren mit Immunzellen infiltriert. Bei 2 Tieren (Tier 12 und 15) war diese lokale Immunantwort bereits so stark ausgeprägt, dass sich ihre Transplantate im Übergang zur Phase 3 befanden, die durch eine transmurale zelluläre Infiltration charakterisiert ist. Ein Tier der Gruppe II.B (Tier 6) war hingegen zu diesem Zeitpunkt klinisch unauffällig und zeigte lediglich minimale Abschilferung der Zottenspitzen (Phase 0-1).

Tabelle 4.3 unterlegt, dass sich die Tiere der Gruppe II.B zum Zeitpunkt der Organentnahme überwiegend in einer frühen Phase der Abstoßung befanden (Tier 5, 7 und 8). In der Gruppe II.D ist die Transplantatdestruktion zum Obduktionszeitpunkt insbesondere bei einem Tier (Tier 12) schon weit fortgeschritten. Bei nicht-immunisierten Tieren (Tier 15) fand sich eine ähnlich weit fortgeschrittene akute Abstoßungsreaktion erst nach deutlich längerer Transplantatfunktionsdauer.





**Abb. 4.8: Histologien zur Versuchsgruppe II: Dünndarmtransplantation mit hochdosierter Immunsuppression von 15 mg/kg KG CsA von Tag 0-13.** A) Syngene Kontrolle, B) RT1.B2-immunisiertes Tier (Untergruppe II.B2) am Tag 64, C) RT1.D2-immunisiertes Tier (Untergruppe II.D2) am Tag 56, D) nicht immunisiertes Kontrolltier (Untergruppe II.0) am Tag 122. Untergruppe II.0: Empfängertiere wurden nicht mit Allopeptid immunisiert; Untergruppe II.D2: Empfängertiere wurden mit Allopeptid RT1.D2 immunisiert; Untergruppe II.B2: Empfängertiere wurden mit Allopeptid RT1.B2 immunisiert.

Neben den akuten Abstoßungsreaktionen waren Zeichen einer leichten (1 von 7 Tieren) bis moderaten (4 von 7 Tieren) Vaskulopathie zu erkennen. Diese Tiere zeigten vor allem eine Intimahyperplasie. In drei Fällen konnte die Adhäsion mononukleärer Zellen am Arterienendothel (Endothelialitis) festgestellt werden. Außerdem trat in drei Fällen eine leichte Muskularishypertrophie auf. Wiederum bestanden zwischen den Gruppen keine wesentlichen Differenzen. Bei dem Tier der Gruppe II.B (Tier Nr. 6), bei dem die Organentnahme im klinisch unauffälligen Zustand erfolgt war, fanden sich keine Anzeichen für eine Vaskulopathie. Ebenso bei einem weiteren Tier dieser Gruppe (Tier Nr. 7), das sich jedoch in Phase 2 der akuten Abstoßungsreaktion befand.

**Tabelle 4.3: Pathohistologische Beurteilung der Transplantate der Versuchsgruppe II: Dünndarmtransplantation mit hochdosierter Immunsuppression von 15 mg/kg KG CsA von Tag 0-13.** Gruppe II.0: Empfängertiere wurden nicht mit einem Allopeptid immunisiert; Gruppe II.D2: Empfängertiere wurden mit dem Allopeptid RT1.D2 immunisiert; Gruppe II.B2: Empfängertiere wurden mit dem Allopeptid RT1.B2 immunisiert.

Tier/ Gruppe	Obduktion* (Tag)	Akute Abstoßungsreaktion				Chronische Abstoßungsreaktion			
		Mukosa			Phase	Vaskulopathie			Grad
		Zotten- abstum- pfung	Kryp- titis	Infiltra- tion		Intima- hyperplasie	Muscularis- hyper- trophie	Perivas- kuläres Infiltrat	
5/II.B	43	+	+	(+)	<b>1</b>	+, E	(+)	---	leicht
6/II.B	64	(+)	---	---	---	---	---	---	---
7/II.B	57	++	+	+	<b>2</b>	---	---	---	---
8/II.B	55	+	+	+	<b>2</b>	++	(+)	---	moderat
10/II.D	56	++	+	+	<b>2</b>	+, E	+	---	moderat
12/II.D	36	++	+	++	<b>2-3</b>	+, E	---	+	moderat
15/II.0	122	+	+	++	<b>2-3</b>	++	---	---	moderat

Die Bewertung der akuten Abstoßungsreaktion orientiert sich an den von Rosemurgy und Schraut definierten Phasen (siehe Material und Methoden). ++ = moderat, + = leicht, (+) = minimal, E = Endothelialitis

\*) Kriterium für die Obduktion war ein anhaltender Gewichtsverlust >2% über ≥ 6 Tage

Die präoperative Applikation der Allopeptide RT1.B2 und RT1.D2 führte somit unter einer kurzzeitigen Hochdosis-Immunsuppression nicht nur zur beschleunigten klinischen Transplantatabstoßung. Insbesondere Tiere der Gruppe II.D wiesen schon zu frühen Zeitpunkten nach Transplantation akute Abstoßungsreaktionen auf, die in der Kontrollgruppe II.0 erst weit über Tag 100 post transplantationem gefunden wurden. Wiederum schien die Applikation des immunogeneren Peptides RT1.D2 zu ausgeprägteren akuten Abstoßungsreaktionen zu führen als die Applikation des Peptides RT1.B2. Auch chronische Abstoßungsvorgänge waren nach vorheriger Immunisierung mit RT1.B2 weniger ausgeprägt als nach Immunisierung mit RT1.D2. Eventuell stehen diese Beobachtungen in Zusammenhang mit der Transplantatlangzeitfunktion eines Tieres der Gruppe II.B (Tier Nr. 6).

### **4.2.3 Allopeptid-induzierte Effekte unter niedrig dosierter Langzeit-Immunsuppression**

Durch eine hoch dosierte Immunsuppression kann die Transplantatfunktion in Allopeptid-sensibilisierten Tieren im Vergleich zu Allopeptid-sensibilisierten Tieren ohne Immunsuppression verlängert werden (Tab. 4.1 und 4.2). Durch die Allopeptide wurden zwar antigenspezifische T-Lymphozyten *in vivo* generiert, doch wurde durch Cyclosporin A die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) blockiert, der für die Transkription von IL-2 und weiterer Cytokine von großer Bedeutung ist. CsA ist jedoch nicht in der Lage, die nach Transplantation auftretende massive Immunaktivierung vollständig zu „beseitigen“, da nach Absetzen der Immunsuppression die gegen das Transplantat gerichtete Immunantwort erneut „aufflammt“ und die Transplantate dann verzögert abgestoßen werden.

Um zu untersuchen, ob Allopeptid-sensibilisierte Tiere von einem niedrig dosierten Langzeit-Immunsuppressions-Schema aus höher dosierter, kurzzeitiger Immunsuppression kombiniert mit niedrig dosierter, verlängerter Immunsuppression profitieren, erhielten die Transplantatempfänger für sieben Tage CsA in einer Dosis von 5 mg/kg KG und danach bis Tag 30 in einer Dosierung von 1 mg/kg KG. Insgesamt erhielten die Tiere mit diesem Dosis-schema 63 mg/kg KG CsA im Vergleich zur hoch dosierten Immunsuppression mit 210 mg/kg KG (Tab. 4.2). Die Peptidapplikation in den Untergruppen III.B und III.D erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

**Tabelle 4.4: Versuchsgruppe III: Dünndarmtransplantation mit Langzeit-Immunsuppression von 5 mg/kg KG CsA von Tag 0-7 und 1 mg/kg KG von Tag 8-30.** Gruppe III.0: Empfängertiere wurden nicht mit Allopeptid immunisiert; Gruppe III.D: Empfängertiere wurden mit Allopeptid RT1.D2 immunisiert; Gruppe III.B: Empfängertiere wurden mit Allopeptid RT1.B2 immunisiert.

Gruppe	Peptid *)	N	Transplantatfunktion in Tagen **)	Mittelwert $\pm$ Stabw ***)
III.0	-	7	37, 43, 47, 51, 54, 55, 62	49,9 $\pm$ 8,3
III.B	RT1.B2	7	III.B-1: 42, 43, 45, 50 III.B-2: 78, 120 (x2) ****)	45 $\pm$ 3,6 106 $\pm$ 24,2
III.D	RT1.D2	7	42, 45, 47, 47, 51, 53	47,1 $\pm$ 3,8

\*) subkutane Peptidapplikation sieben Tage vor und während der Dünndarmtransplantation (Tag -7/0).

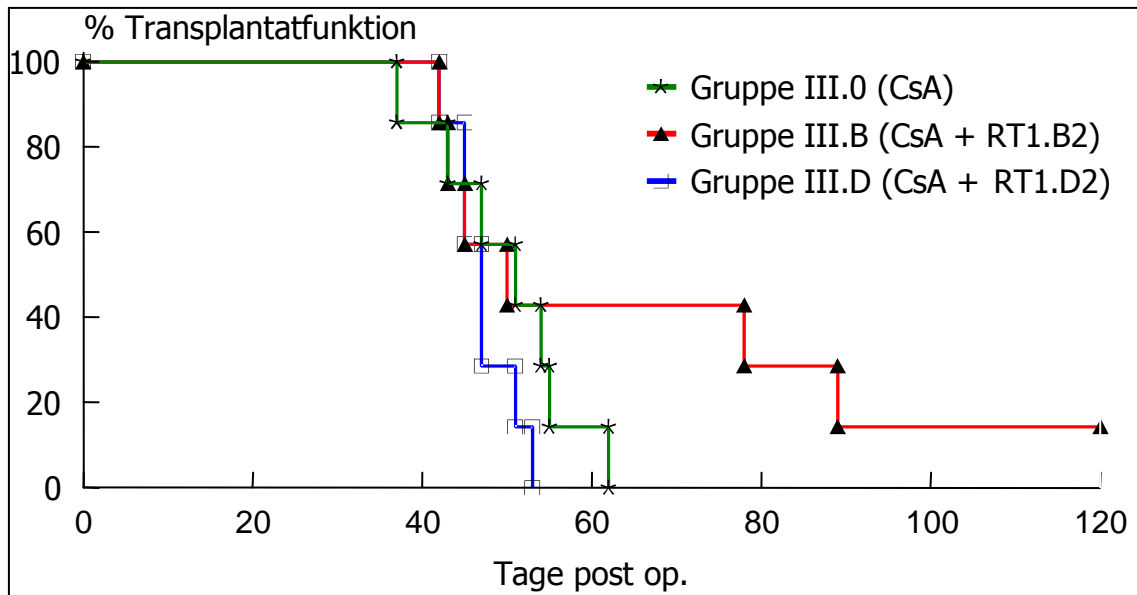
\*\*) Kriterium für die Obduktion war ein anhaltender Gewichtsverlust >2% über  $\geq$  6 Tage, sowie eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit Rötung von Nase und Ohren, struppigem Fell, abdomineller Verhärtung bzw. Tumor und ggf. Aszites.

\*\*\*) Standardabweichung (Angabe in Tagen).

\*\*\*\*) Versuchsabbruch nach 120 Tagen bei unauffälliger Klinik

Mit diesem immunsuppressiven Protokoll lag die Transplantatfunktionszeit der Kontrollgruppe bei 50 Tagen (49,9  $\pm$  8,3 Tage). Eine Immunisierung mit Peptid RT1.D2 in Kombination mit der Langzeit-Immunsuppression hatte keinen Einfluss auf die Transplantatfunktion: Die Tiere der Gruppe III.D stießen ihr Transplantat nach durchschnittlich 47 Tagen (47,1  $\pm$  3,8 Tage) ab.

Anders die Tiere, denen präoperativ RT1.B2-Peptid appliziert wurde (Gruppe III.B): Die Immunisierung mit diesem Peptid in Kombination mit der Langzeit-Immunsuppression verlängerte bei 43 % der Transplantatempfänger die Transplantatfunktion auf mehr als 100 Tage (106  $\pm$  24,2 Tage). Bei zwei Tieren (29%) wurde sogar eine Transplantatlangzeitfunktion induziert. Als der Versuch an Tag 120 endete, waren beide Tiere klinisch unauffällig (Abb. 4.8, Seite 41).



**Abb. 4.9: Kaplan-Meyer-Kurve zur Funktionsdauer von Dünndarmtransplantaten der Versuchsgruppe III: Dünndarmtransplantation mit Langzeit-Immunsuppression von 5 mg/kg KG CsA von Tag 0-7 und 1 mg/kg KG von Tag 8-30.** Die Langzeit-Immunsuppression in Kombination mit dem Allopeptid RT1.B2 war sehr erfolgreich (s. auch Tab. 4.4). Die Transplantatabstoßung wurde über den Gewichtsverlust von 2 % an jeweils 6 aufeinanderfolgenden Tagen klinisch festgestellt.

Wie bereits erwähnt, profitierten die Tiere der Kontrollgruppe III.0 nicht von dieser Langzeit-Immunsuppression (Tab. 4.4 und Abb. 4.9). Mit einer durchschnittlichen Transplantatfunktionszeit von  $49,9 \pm 8,3$  Tagen stießen diese Tiere ihr Transplantat sogar schneller ab als im Vergleich zur hoch dosierten Immunsuppression ( $88 \pm 19,8$  Tage, Tab. 4.2). Im Gegensatz dazu die Tiere der Gruppe III.B, die im Vergleich zur hoch dosierten Immunsuppression ( $51,7 \pm 7,6$  Tage, Tab. 4.2) von der Langzeit-Immunsuppression profitierten. Zwar war eine Verlängerung der Transplantatfunktionszeit nicht bei allen Tieren dieser Gruppe zu beobachten, doch zumindest bei 3 von 7 Tieren (43 %), während bei der hoch dosierten Immunsuppression nur 1 von 4 Tieren (25 %) eine verlängerte Transplantatfunktionszeit aufwies (Tab 4.2 und 4.4).

## ***Makroskopischer Befund des Situs***

Bei der Exploration des Situs wurde insbesondere auf das Transplantat (Dünndarm, Mesenterium und mesenteriale Lymphknoten) geachtet. Zudem wurden die Milz und der Zustand der Bauchhöhle (Aszites, Peritonitis) beurteilt.

### **Gruppe III.0: Niedrig dosierte Langzeit-Immunsuppression mit CsA**

Vier von 7 Transplantaten wiesen eine schlechte Perfusion auf, zudem wurden Nekrosen beobachtet. Die Darmwand war bei 2 von 7 Transplantaten verdickt; bei 3 von 7 Transplantaten lag ein Ileus im Bereich der Anastomosen vor; 3 von 7 Transplantaten wiesen keine Peyer-Plaques mehr auf, während sie bei 4 von 7 Transplantaten sehr stark verringert waren. Die mesenterialen Lymphknoten waren stets vergrößert und fibrosiert; zudem sahen die Mesenterien überwiegend milchig weiß aus (5 von 7 Transplantaten), zwei waren gänzlich fibrosiert. Drei von 7 Transplantaten waren mit dem Omentum majus und/oder der Bauchwand verwachsen. Zwei Tiere wiesen Aszites auf, und 4 Tiere zeigten eine Splenomegalie.

**Tabelle 4.5: Situsbeurteilung der Tiere aus Gruppe III: Dünndarmtransplantation mit Langzeit-Immunsuppression von 5 mg/kg KG CsA von Tag 0-7 und 1 mg/kg KG von Tag 8-30.** Gezeigt ist die Gruppe III.0: Tiere wurden nicht mit Peptid immunisiert, sondern erhielten postoperativ nur die Immunsuppression mit CsA.

Tier Nr.	schlechte Perfusion	Nekrosen	Wand verdickt	Ileus	Peyer Plaques	Mesenterial-fibrose	Verwachsungen	Aszites	Spleno megalie	Grad der Veränderung
29	---	---	X	X	X	X	---	---	---	SCHWER SEHR
30	X	X	X	X	---	X	---	X	---	SCHWER SEHR
31	X	X	---	X	---	X	X	X	X	SCHWER
36	---	X	---	---	X	X	X	---	X	SCHWER
38	X	---	X	---	---	X	X	---	X	SCHWER
40	---	X	---	---	---	X	---	---	---	MODERAT
42	X	---	---	---	X	X	---	---	X	SCHWER

X = Auftreten der Veränderung. Jede Veränderung wurde mit einem Punkt bewertet und die Addition der Punkte führte zu einem Bewertungsscore: 0-1 Punkt = LEICHT, 2-3 Punkte = MODERAT, 4-5 Punkte = SCHWER, >6 Punkte = SEHR SCHWER.

Insgesamt zeigten die Transplantate bei 4 von 7 Tieren vorwiegend schwere und bei 2 von 7 Tieren sehr schwere Veränderungen. Nur bei einem Tier traten lediglich moderate Veränderungen auf.

**Gruppe III.D: Immunisierung mit RT1.D2 und anschließender niedrig dosierter Langzeit-Immunsuppression mit CsA**

Die beobachteten makropathologischen Veränderungen an den Transplantaten dieser Gruppe entsprachen denen der Gruppe III.0. Ein Tier konnte nicht eröffnet und beurteilt werden, da es noch vor Obduktion verstarb. Die Transplantate der verlebenden sechs Tiere waren wie folgt: Zwei Transplantate wiesen mittelschwere Veränderungen auf, drei Transplantate zeigten schwere und ein Transplantat sogar sehr schwere Veränderungen. Die Mesenterien sämtlicher Transplantate waren verdickt und alle mesenterialen Lymphknoten fibrosiert. Im Gegensatz zur Gruppe III.0 war die Wand des Transplantates fast immer verdickt (5 von 6 Transplantate); allerdings wiesen nur 2 Transplantate einen Ileus im Bereich der Anastomose auf. Die Hälfte der Transplantate zeigte schwere Verwachsungen. Die Hälfte der Tiere wies Aszites auf, und Splenomegalie wurde bei drei Tieren vorgefunden.

Insgesamt schienen die Transplantate besser durchblutet zu sein als bei Gruppe III.0: Nekrosen waren nur bei 2 Transplantaten zu beobachten und lediglich ein Transplantation wies kaum mehr Peyer-Plaques auf.

**Tabelle 4.6: Situsbeurteilung der Tiere aus Gruppe III: Dünndarmtransplantation mit Langzeit-Immunsuppression von 5 mg/kg KG CsA von Tag 0-7 und 1 mg/kg KG von Tag 8-30.** Gezeigt ist die Gruppe III.D: Sensibilisierung mit RT1.D2 vor Transplantation und niedrig dosierter Langzeit-Immunsuppression.

Tier Nr.	schlechte Perfusion	Nekrosen	Wand verdickt	Ileus	Peyer Plaques	Mesenterial-fibrose	Verwachsungen	Aszites	Splenomegalie	Grad der Veränderung
16	---	X	---	---	---	X	X	X	---	SCHWER
19	---	X	X	---	X	X	---	---	X	SCHWER
20	---	---	X	---	---	X	---	X	---	MODERAT
21	X	---	X	---	---	X	X	---	X	SCHWER
23	---	---	X	X	---	X	---	---	---	MODERAT SEHR
28	X	---	X	X	---	X	X	X	X	SCHWER

X = Auftreten der Veränderung. Jede Veränderung wurde mit einem Punkt bewertet und die Addition der Punkte führte zu einem Bewertungsscore: 0-1 Punkt = LEICHT, 2-3 Punkte = MODERAT, 4-5 Punkte = SCHWER, >6 Punkte = SEHR SCHWER.

**Gruppe III.B: Immunsierung mit RT1.B2 und anschließender niedrig dosierter Langzeit-Immunsuppression mit CsA**

Die Transplantate dieser Gruppe wiesen ein heterogenes Bild auf (Tab. 4.9). Die Tiere, deren Überlebensdauer sich nicht von den Gruppen III.0 und III.D unterschied (Tier 25, 27, 35 und 41), entsprachen auch im Schweregrad der makroskopischen Veränderungen denen der Gruppen III.0 und III.D, wobei insbesondere schwere bis sehr schwere Veränderungen nachweisbar waren.

Die zwei Transplantate mit Langzeitfunktion wiesen allenfalls leichte Veränderungen auf: Bei Tier 37 ergaben sich außer einer leichten Mesenterialfibrose keinerlei Auffälligkeiten; der Situs von Tier 43 war gänzlich unauffällig! Auch beim dritten Tier mit Langzeitüberleben (Tier 26, Tag 78) waren die Situsveränderungen noch moderat und betrafen vor allem die Darmwand (Verdickung, Fehlen von Peyer-Plaques).



**Tabelle 4.7: Situsbeurteilung der Tiere aus Gruppe III:** Dünndarmtransplantation mit Langzeit-Immunsuppression von 5 mg/kg KG CsA von Tag 0-7 und 1 mg/kg KG von Tag 8-30. Gezeigt ist die Gruppe III.B: Sensibilisierung mit RT1.B2 und niedrigdosierter Immunsuppression.

Tier Nr.	schlechte Perfusion	Nekrosen	Wand verdickt	Ileus	Peyer Plaques	Mesenterial-fibrose	Verwachsungen	Aszites	Splenomegalie	Grad der Veränderung
25	X	---	X	---	---	X	---	---	---	MODERAT
26	---	X	X	X	---	---	---	---	---	MODERAT SEHR
27	X	X	X	---	X	X	X	---	X	SCHWER
35	X	---	---	---	X	X	---	---	X	SCHWER
37	---	---	---	---	---	X	---	---	---	LEICHT
41	X	---	X	---	---	X	---	---	X	SCHWER UNAUFGÄLLIG
43	---	---	---	---	---	---	---	---	---	FÄLLIG

X = Auftreten der Veränderung. Jede Veränderung wurde mit einem Punkt bewertet und die Addition der Punkte führte zu einem Bewertungsscore: 0-1 Punkt = LEICHT, 2-3 Punkte = MODERAT, 4-5 Punkte = SCHWER, >6 Punkte = SEHR SCHWER.

### Überblick zur Situsbeurteilung

1. Sofern es zu einer Transplantatabstoßung kam, wiesen sämtliche Transplantate der Versuchsgruppe III ähnlich ausgeprägte makropathologische Veränderungen auf.
2. Transplantate der Gruppe III.0 waren überwiegend schlecht perfundiert.
3. Transplantate der Tiere, die mit RT1.D2 immunisiert worden waren, zeigten Wandveränderungen, während die Perfusion gut war.
4. Transplantate der Tiere, die mit RT1.B2 immunisiert worden waren, unterschieden sich stark in ihren Veränderungen. Die Transplantate mit Langzeitfunktion zeigten allenfalls minimale makropathologische Veränderungen am Mesenterium und den angrenzenden Lymphknoten.

## Mikroskopischer Befund der Transplantate

Die mikrohistologischen Veränderungen an den Transplantaten der Versuchsgruppe III sind in Tab. 4.8 zusammengefasst.

**Tabelle 4.8: Übersicht der pathohistologischen Veränderungen in Versuchsgruppe III: Dünndarmtransplantation mit Langzeit-Immunsuppression von 5 mg/kg KG CsA von Tag 0-7 und 1 mg/kg KG von Tag 8-13.** Gezeigt sind die 3 Gruppen III.D, III.B und III.0.

■ Gruppe III.D (RT1.D2)    ■ Gruppe III.B (RT1.B2)    □ Gruppe III.0

Tier	Obduktion* (Tag)	Akute Abstoßungsreaktion			Chronische Abstoßungsreaktion				
		Mukosa			Phase	Vaskulopathie			Grad
		Zotten-abstumpfung	Kryptitis	Infiltration		Intima-hyperplasie	Muscularis-hyper-trophie	perivas-kuläres Infiltrat	
16	53	+	+	---	2	+	+	---	moderat
19	47	+	+	+	2	---	(+)	---	---
20	45	+	+	---	2	---	(+)	---	---
21	51	(+)	+	---	1	---	(+)	++	leicht
23	47	+	+	---	2	+, E	+	+	moderat
28	45	++	+	+	2-3	+	---	+	moderat
25	42	++	++	++	3	---	+	++	leicht
26	78	+	+	+	2	---	+	+	leicht
27	43	++	+	---	2	---	(+)	(+)	leicht
35	50	+	+	---	2	+	+	+	moderat
37	117	---	---	---	0	---	---	---	---
41	45	++	+	+	2-3	+, E, A	+	+	moderat
43	89	---	---	---	0	---	---	---	---
29	51	+	+	---	2	---	+	---	---
30	43	++	+	++	3	+	+	+	moderat
31	37	+++	+	+++	3	---	+	+	leicht
36	47	+++	+	+	3	---	+	---	---
38	62	+	+	---	2	---	+	+	leicht
40	54	+	(+)	---	1-2	+, E, A	+	+	moderat
42	55	+	+	---	2	---	+	+	leicht

Die Bewertung der akuten Abstoßungsreaktion orientiert sich an den von Rosemurgy und Schraut definierten Phasen (siehe Material und Methoden). +++ = schwer, ++ = moderat, + = leicht, (+) = minimal, E = Endothelialitis, A = Arteriitis

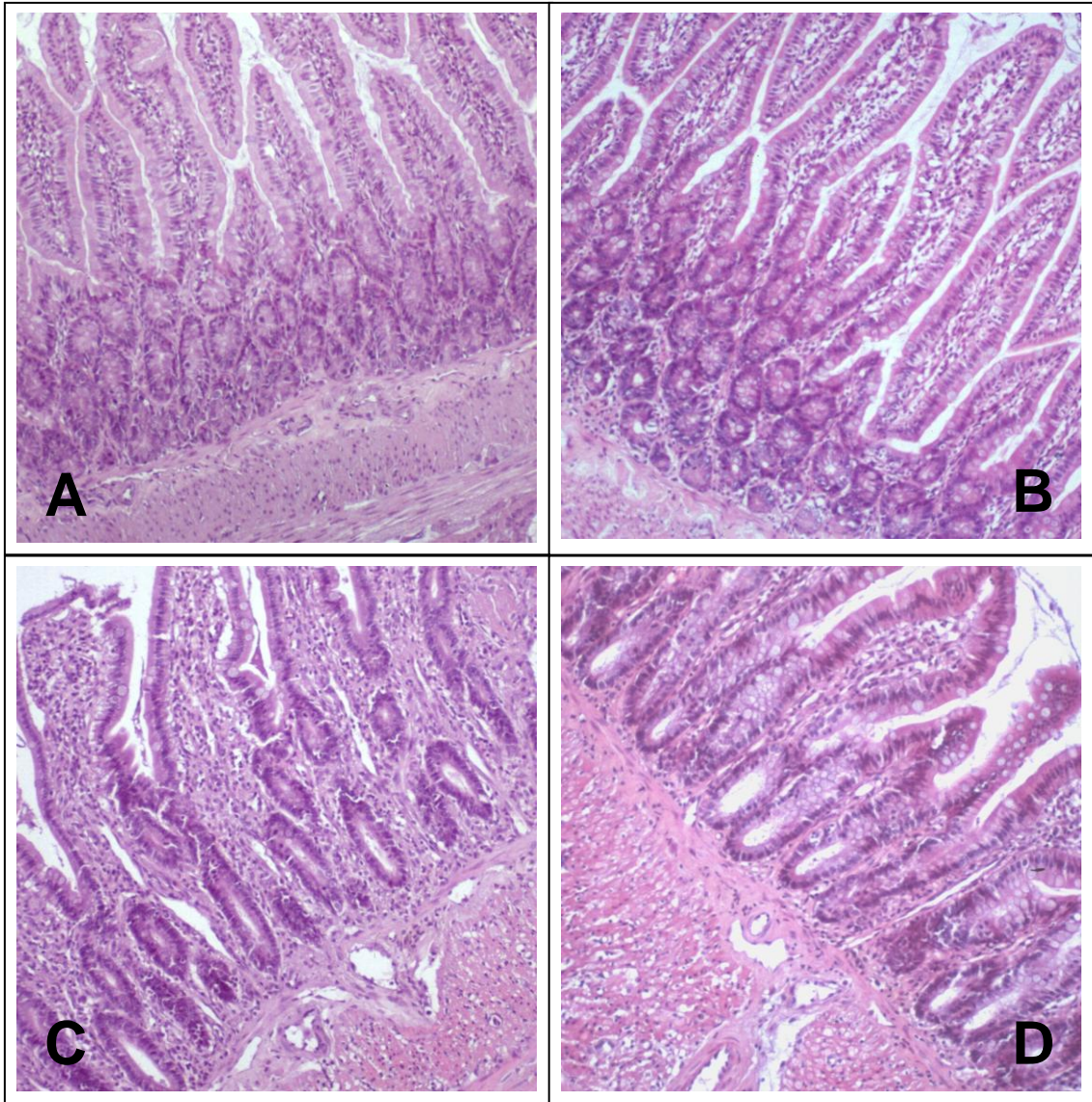
\*) Kriterien für die Obduktion war eine Gewichtsabnahme >2% an sechs aufeinanderfolgenden Tagen

Zur besseren Übersicht werden die Gruppen zusammen betrachtet und nicht wie bei den makroskopischen Ergebnissen jede Gruppe einzeln.

Verglichen mit den Transplantaten der Versuchsgruppe II, die eine kurzzeitige hoch dosierte Immunsuppression erhielten (Tab. 4.2), fanden sich bei den Transplantaten der Versuchsgruppe III zum Zeitpunkt der Organentnahme vermehrt Zeichen der akuten Abstoßung. Insgesamt waren 4 Transplantate bereits in Phase 3 der Abstoßung; drei von ihnen gehörten zur Gruppe III.0. Die Zotten waren vollkommen abgeflacht, und ein dichtes transmurales Infiltrat war vorzufinden.

Während sich zum Zeitpunkt der Organentnahme eine Reihe von Transplantaten der Gruppe III.0 (3 von 7) bereits in Phase 3 befand, waren die Transplantate der Gruppe III.D überwiegend in Phase 2 (5 von 6 Transplantaten).

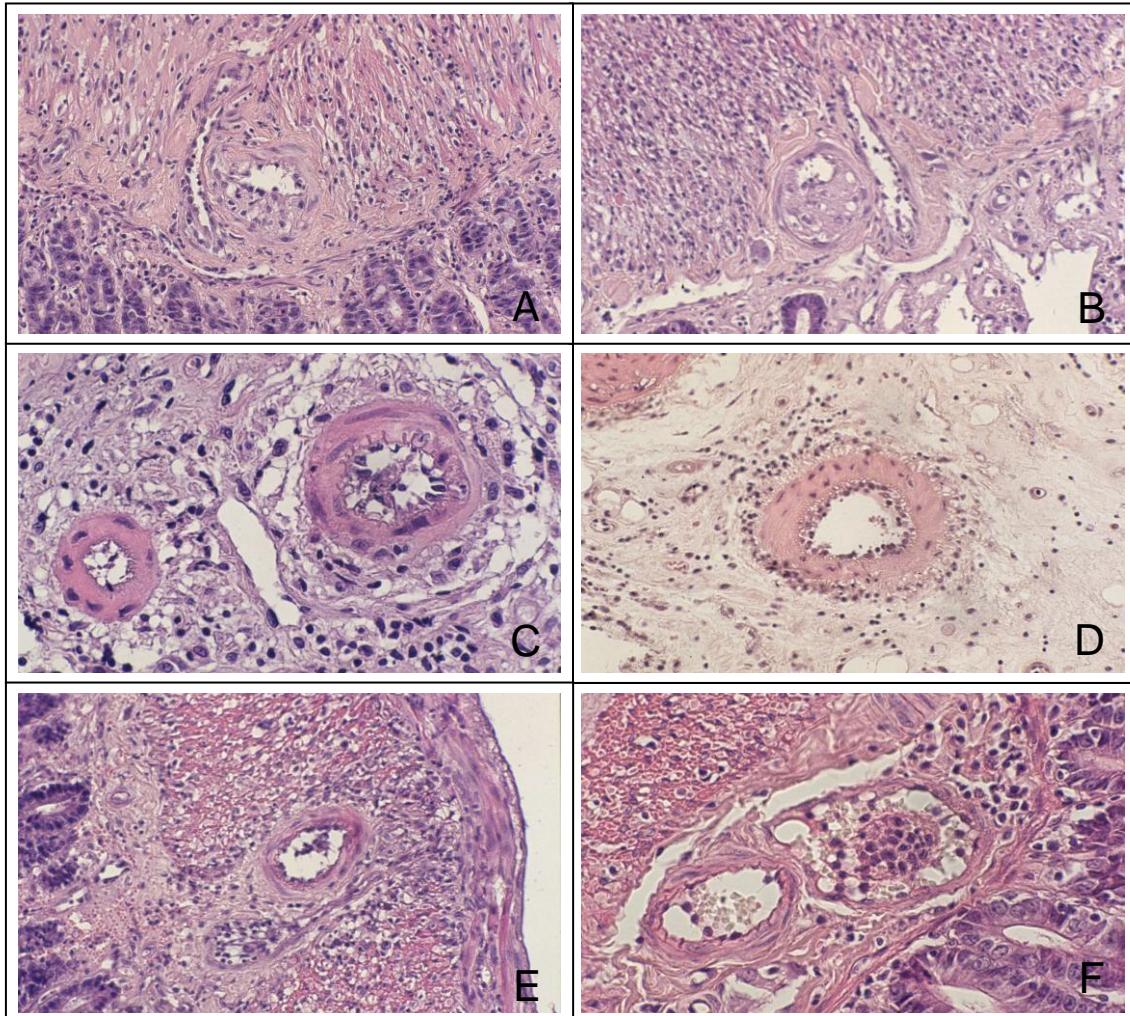
Transplantate der Gruppe III.B wiesen ein histologisches Bild der Abstoßung auf, das sich zwischen den beiden anderen Gruppen befand. Die beiden Transplantate, die eine Langzeitfunktion aufwiesen, waren weitgehend unauffällig. Hier fanden sich lediglich leichte Abschilferungen an den Zottenspitzen. Das Transplantat, das bis Tag 78 eine Funktion aufwies, war bereits in Phase 2 der Abstoßung.



**Abb. 4.10: Histologien der Mukosa der Versuchsgruppe III: Dünndarmtransplantation mit Langzeit-Immunsuppression von 5 mg/kg KG CsA von Tag 0-7 und 1 mg/kg KG von Tag 8-30. A) Syngene Kontrolle am Tag 100, B) Immunisierung mit RT1.B2, Tag 120, C) Immunisierung mit RT1.D2, Tag 51, D) Nicht-immunisierte Kontrolle, Tag 51.**

Veränderungen an den Gefäßen, die auf eine chronische Immunantwort hindeuteten, waren unabhängig von Allopeptid- und CsA-Applikation zu beobachten: 7 der 20 Transplantate zeigten leichte und 7 von 20 Transplantaten moderate pathohistologische Veränderungen an den Gefäßen. Dabei war überwiegend eine Muskularishypertrophie festzustellen. Wurde eine Intimahyperplasie beobachtet, konnte sehr häufig parallel dazu eine

Endothelialitis und in manchen Fällen auch eine Arteriitis (monozytäres Infiltrat der Arterienwand) nachgewiesen werden.



**Abb. 4.11: Histologien der Versuchsgruppe III: Dünndarmtransplantation mit Langzeit-Immunsuppression von 5 mg/kg KG CsA von Tag 0-7 und 1 mg/kg KG von Tag 8-30. A) + B) Vaskulopathie. Intimahyperplasie. RT1.D2-immunisiertes Tier am Tag 45 (Tier 28). C) Muskularishypertrophie. Nicht-immunisierte Kontrolle am Tag 54, D) Mesenterium eines RT1.D2-immunisierten Tieres am Tag 51 (Tier 21): Hyperplasie von Intima und Muskularis, sowie ein dichtes lympho-monozytäres Infiltration der Intima und perivaskulär. **Perivaskuläres Infiltrat und Hämorrhagien.** E) Dichtes perivaskuläres lympho-monozytäres Infiltrat sowie Hämorrhagie der Lamina muscularis bei einem RT1.D2-immunisierten Tier am Tag 47 (Tier 23), F) Thrombosierung eines Gefäßes aufgrund lympho-monozytären Infiltrates bei einem RT1.B2-immunisierten Tier am Tag 50 (Tier 35).**

## **Zusammenfassung von Kapitel 4.2**

Während in Kapitel 4.1 nach Immunisierung Allopeptid-spezifische T-Lymphozyten *in vitro* charakterisiert wurden, waren in Kapitel 4.2 die Auswirkungen dieser Immunisierung auf die Funktionsdauer von Organtransplantaten Gegenstand der Untersuchungen.

Zusammengefasst ergibt sich Folgendes:

1. Ohne Immunsuppression war die Transplantatfunktionszeit Allopeptid-sensibilisierter Tiere im Vergleich zu nicht sensibilisierten Tieren deutlich verkürzt (Tab. 4.1).
2. Immunsuppression verzögerte den Zeitpunkt der Transplantatabstoßung auch in Allopeptid-sensibilisierten Tieren. Doch im Vergleich zu nicht sensibilisierten Kontrolltieren war der Zeitpunkt der Transplantatabstoßung auch unter diesen Bedingungen früher (Tab. 4.2 und 4.4).
3. Niedrig dosierte Langzeit-Immunsuppression in Kombination mit Allopeptid RT1.B2 verlängerte in 3 von 7 Tieren die Transplantatfunktionszeit um mehr als das Doppelte (Tab. 4.4).
4. Die makroskopischen Veränderungen am Transplantat Allopeptid-immunisierte Tiere waren nach niedrig dosierter Langzeit-Immunsuppression geringer als bei den Kontrolltieren. Dabei spielte es keine Rolle, ob mit RT1.B2 oder RT1.D2 immunisiert worden war (Tab. 4.5 bis 4.7).
5. Auch die mikroskopischen Veränderungen am Transplantat waren zum Zeitpunkt der Abstoßung bei nicht-immunisierten Tieren weiter fortgeschritten (Tab. 4.8).

## **4.3 Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten nach Organtransplantation**

Durch Applikation des weniger immunogenen Allopeptids RT1.B2 in Kombination mit einer niedrig dosierten Langzeitimmunsuppression wurde bei 3 von 7 Tieren (dies entspricht 43 %) eine Langzeitfunktion (> 70 Tage) ihrer Trans-

plantate beobachtet (Abb. 4.9, Seite 34). Um ein vergleichbares Ergebnis ohne Allopeptid zu erhalten, ist eine dreimal höhere Dosis an CsA notwendig (Tab. 4.2, Gruppe II.0). Diese Daten lassen somit den Schluss zu, dass das Allopeptid RT1.B2 mit niedrig dosiertem CsA synergistisch bzw. additiv wirkt.

Um zu untersuchen, ob die Immunisierung mit dem Allopeptid RT1.B2 und die anschließende Immunsuppression tatsächlich den Pool antigenspezifischer T-Lymphozyten effektiver beeinflusst als das Allopeptid RT1.D2, wurden weitere Tiere, die gemäß dem Protokoll (Peptidapplikation, Transplantation und Immunsuppression) der Gruppen III.0, III.B und III.D behandelt wurden, auf die Anwesenheit RT1.B2- und RT1.D2-spezifischer T-Lymphozyten untersucht. In Kapitel 4.1 wurde gezeigt, dass mit dem indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay *in vivo* generierte antigenspezifische T-Lymphozyten *in vitro* durch ihre Proliferation nachzuweisen sind. Hierzu wurde am Tag 20 nach Transplantation, also noch unter Immunsuppression, ein Teil der Tiere auf die Präsenz Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten untersucht.

Die Untersuchung von Milz- und Blutlymphozyten ergab einen eindeutigen Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten in allen drei Gruppen (Tab. 4.9). Dass auch in Tieren der Gruppe III.0, die nicht mit Allopeptid immunisiert wurden, *in vitro* T-Lymphozyten nachgewiesen wurden, die sich mit Allopeptid RT1.B2 und RT1.D2 restimulieren ließen, ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei den beiden Allopeptiden um spenderspezifische Antigene handelt, die im Rahmen der Abstoßung eine Rolle spielen.

**Tabelle 4.9 (Seite 45): Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten in Transplantatempfängern der Versuchsgruppe III.** Hierzu wurden Lymphozyten aus Milz und Blut isoliert und *in vitro* mit den beiden Allopeptiden RT1.B2 und RT1.D2 restimuliert. Siehe hierzu auch Kapitel 4.1 bzw. Material und Methoden.

Gruppe	Tag 20				Tag 40			
	Nachweis von							
	RT1.B2-spez. T-Lymphozyten		RT1.D2-spez. T-Lymphozyten		RT1.B2-spez. T-Lymphozyten		RT1.D2-spez. T-Lymphozyten	
	Milz	Blut	Milz	Blut	Milz	Blut	Milz	Blut
<b>III.0</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>III.B</b>	(+)	+	(+)	+	---	---	---	---
<b>III.D</b>	(+)	---	+	+	(+)	---	+	+

+ = eindeutiger Nachweis durch starke T-Zellproliferation, (+) = T-Zellproliferation liegt nicht signifikant über der des Kontrollansatzes ohne Peptid, --- = geringere Proliferation als im Kontrollansatz.

Weitere Versuchstiere wurden am Tag 40 (10 Tage nach Ende der Immunsuppression) auf Allopeptid-spezifische T-Lymphozyten in Milz und Blut untersucht. Zu diesem Zeitpunkt waren in den Tieren der Kontrollgruppe III.0 Allopeptid-spezifische T-Lymphozyten nachzuweisen. Ihre dauerhafte Anwesenheit ist sicherlich der Grund dafür, dass die niedrig dosierte Langzeit-Immunsuppression im Vergleich zur hoch dosierten Immunsuppression die Transplantatfunktion nur mäßig um 50 Tage (Tab. 4.4) anstatt um 88 Tage verlängerte (Tab. 4.2).

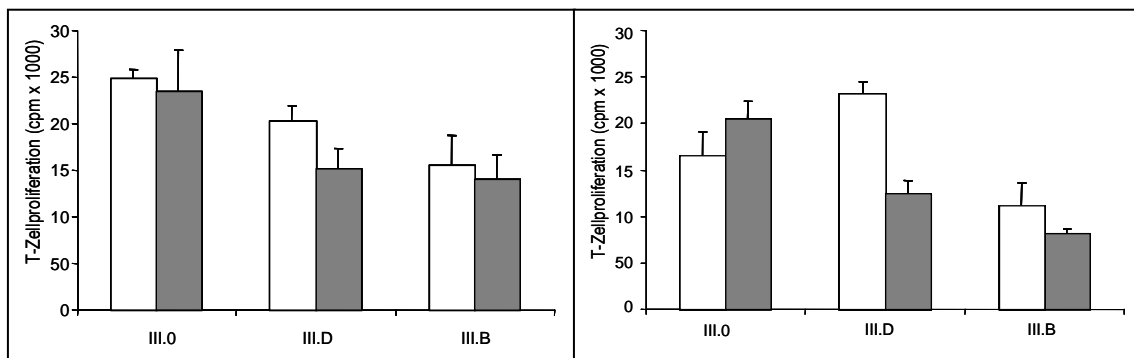
Während am Tag 40 in den Tieren der Gruppe III.D Allopeptid-spezifische T-Lymphozyten nachzuweisen waren, war dies für Tiere der Gruppe III.B erstaunlicherweise nicht der Fall. Dieses Ergebnis könnte somit den Erfolg dieser Kombination aus Allopeptid und Immunsuppression erklären. Da jedoch nicht alle Tiere der Versuchsgruppe III.B von dieser Kombination profitierten, ist in weiteren Untersuchungen der Grund hierfür zu suchen.

Die Ergebnisse des indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay am Beispiel der am **Tag 20** aus Milzen isolierten T-Lymphozyten sind (s. auch Abb. 4.10):

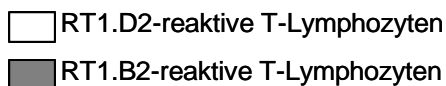
1. Tiere der Versuchsgruppe III.0 wiesen am Tag 20 sowohl RT1.D2- als auch RT1.B2-spezifische T-Lymphozyten auf:  $24.800 \pm 1.083$  cpm und  $23.408 \pm 4.513$  cpm.



2. Tiere der Versuchsgruppe III.D wiesen am Tag 20 ebenfalls RT1.D2- als auch RT1.B2-spezifische T-Lymphozyten auf:  $20.330 \pm 1.681$  cpm und  $15.150 \pm 2.261$  cpm.
3. Tiere der Versuchsgruppe III.B wiesen am Tag 20 ebenfalls RT1.D2- als auch RT1.B2-spezifische T-Lymphozyten auf:  $15.597 \pm 3.203$  cpm und  $13.996 \pm 2.719$  cpm.



**Abb. 4.12: Nachweis Allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten aus Milzen transplantiertter Ratten der Versuchsgruppe III im indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay 20 (links) und 40 Tage (rechts) nach Transplantation.** Auf der X-Achse sind die Gruppen der Versuchsserie III angegeben: III.0: Empfängertiere wurden nicht mit einem Allopeptid immunisiert; III.D: Empfängertiere wurden mit dem Allopeptid RT1.D2 immunisiert; III.B: Empfängertiere wurden mit dem Allopeptid RT1.B2 immunisiert.



Am **Tag 40** nach Transplantation wurde folgende Situation beobachtet:

1. Tiere der Versuchsgruppe III.0 wiesen auch am Tag 40 sowohl RT1.D2- als auch RT1.B2-spezifische T-Lymphozyten auf:  $20.387 \pm 1.973$  cpm und  $16.526 \pm 2.625$  cpm.
2. Tiere der Versuchsgruppe III.D wiesen am Tag 40 ebenfalls RT1.D2- als auch RT1.B2-spezifische T-Lymphozyten auf:  $23.156 \pm 1.292$  und  $12.441 \pm 1.502$  cpm.
3. Tiere der Versuchsgruppe III.B wiesen am Tag 40 RT1.D2- aber *keine* RT1.B2-spezifische T-Lymphozyten auf:  $11.124 \pm 2.454$  cpm und  $8.096 \pm 605$  cpm (Proliferation ohne Peptid:  $8.090 \pm 1.474$  cpm).

## Zusammenfassung des Kapitels 4.3

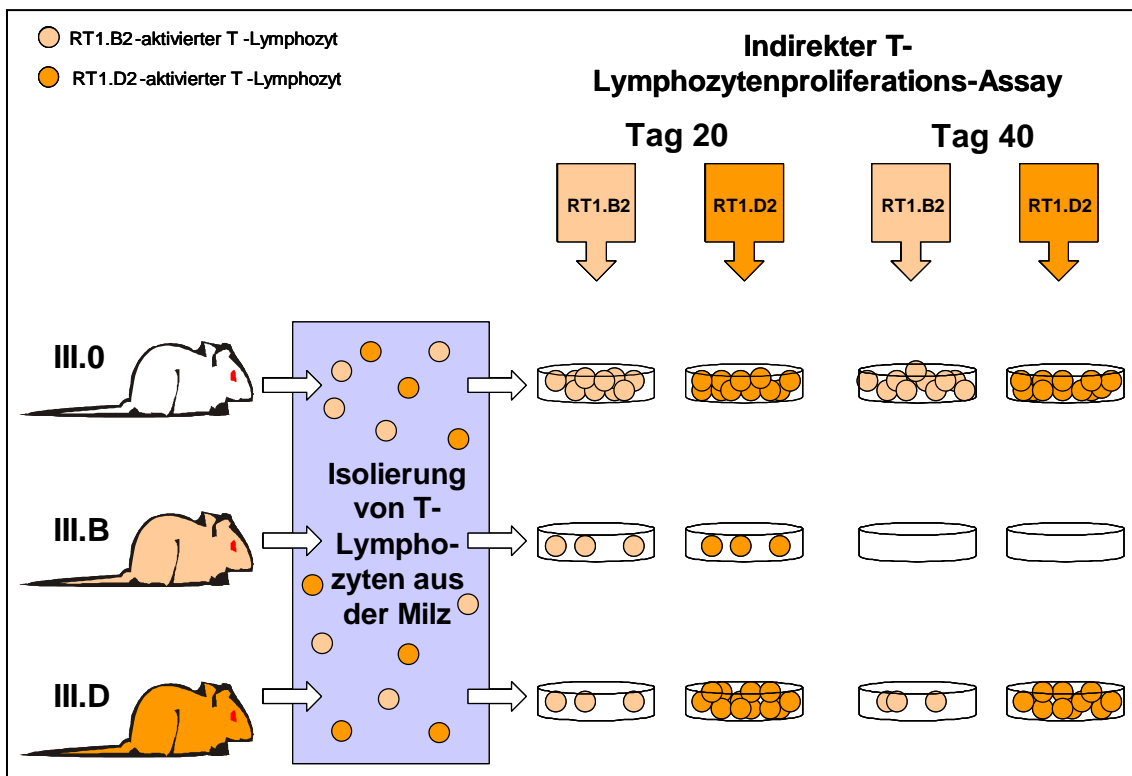


Abb. 4.13: Schematische Darstellung der Ergebnisse zur T-Zell-Proliferation im indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay (Abb. 4.10) für die Versuchsgruppe III.: Dünndarmtransplantation mit Langzeit-Immunsuppression von 5 mg/kg KG CsA von Tag 0-7 und 1 mg/kg KG CsA von Tag 8-13. Die Anzahl der Kugeln zeigt die Stärke der jeweiligen T-Zell-Proliferation.

Bei Tieren, denen präoperativ das Allopeptid RT1.B2 appliziert wurde, waren 40 Tage nach Dünndarmtransplantation keine Allopeptid-spezifischen T-Lymphozyten im indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay nachweisbar. Dieses Ergebnis erklärt möglicherweise die nur in dieser Gruppe beobachtete Transplantatlangzeitfunktion und beruht wahrscheinlich auf einer spezifischen Depletion oder Inhibition RT1.B2-spezifischer T-Lymphozyten. Da aber nur 3 von 7 Tieren dieser Gruppe von der Kombination aus Allopeptid-Applikation und niedrig dosierter Langzeit-Immunsuppression profitierten, sind weitere Untersuchungen unbedingt notwendig, um die Auswirkungen dieser Kombination auf zellulärer Ebene besser zu verstehen.

## 5 Beantwortung der Fragen

---

### 1. Aktivieren die synthetischen MHC-Klasse II-Peptide RT1.B2 und RT1.D2 alloreaktive T-Lymphozyten *in vivo* und lassen sich diese *in vitro* nachweisen?

Die subkutane Immunisierung mit den MHC-Klasse II-Peptiden führt zu einer deutlichen Vergrößerung der drainierenden poplitealen Lymphknoten. Dass sich in diesen Lymphknoten antigen-spezifische T-Lymphozyten befinden, wird mit dem indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay überprüft. Hierbei wird sich die besondere Eigenschaft der MHC-Klasse II-Moleküle zunutze gemacht, dass diese auch von außen mit synthetischen Peptiden beladen werden können. Die Lymphozyten werden aus den lokalen Lymphknoten isoliert und mit syngenen Dendritischen Zellen inkubiert, die mit dem Peptid beladen werden, das auch zur Immunisierung verwendet wurde. Diese Restimulation der antigenspezifischen T-Lymphozyten wird über den Einbau von radioaktivem Thymidin quantifiziert. Der T-Zell-Proliferationsassay ist streng antigen-spezifisch und basiert auf dem immunologischen Gedächtnis aktivierter T-Lymphozyten. Naive T-Lymphozyten werden in diesem Assay nicht aktiviert. Dieser Assay eignet sich deshalb ausgezeichnet, um die Präsenz alloreaktiver T-Lymphozyten nach Organtransplantation nachzuweisen.

Die beiden in dieser Arbeit getesteten synthetischen Peptide sind immunogen, wobei RT1.D2 eine stärkere Restimulierung antigenspezifischer T-Lymphozyten *in vitro* auslöst und deshalb als immundominantes Peptid bezeichnet wird.

### 2. Beschleunigen die synthetischen MHC-Klasse II-Peptide RT1.B2 und RT1.D2 die Transplantatabstoßung?

Werden in der Spender-Empfänger-Kombination WF auf LEW Dünndarmtransplantate übertragen, so werden diese ohne Immunsuppression innerhalb von 5 Tagen ( $5,3 \pm 0,5$  Tagen) zerstört. Die prä- bzw. intraoperative Applikation der

beiden Peptide beschleunigte die Abstoßung um ca. 2 Tage: RT1.B2 löste eine Abstoßung nach  $3,5 \pm 0,6$  Tagen und RT1.D2 nach  $3,3 \pm 0,5$  Tagen aus. Diese Daten lassen vermuten, dass auch der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung für die akute Abstoßung von Bedeutung ist.

**3. Verzögert die kombinierte Gabe der synthetischen MHC-Klasse II-Peptide RT1.B2 und RT1.D2 und Cyclosporin A die Transplantatabstoßung? Falls ja, sind in Transplantaten mit Langzeitfunktion alloreaktive T-Lymphozyten nachzuweisen?**

Auch unter einer kurzfristigen hochdosierten Immunsuppression mit Cyclosporin A wurden allogene Dünndarmtransplantate nach Peptidapplikation schneller abgestoßen als bei Tieren ohne Immunisierung. In Empfängertieren, die das immundominante Peptid RT1.D2 erhalten hatten, war die Abstoßung im Vergleich zu Tieren, die mit RT1.B2 immunisiert worden waren, sogar noch beschleunigt (Tab. 4.2):

$88 \pm 19,8$  Tage (Kontrolle),  $51,7 \pm 7,6$  Tage (RT1.B2) und  $46 \pm 14,1$  Tage (RT1.D2). Ein mit RT1.B2 immunisiertes Tier zeigte zum Zeitpunkt der Organentnahme keinerlei klinische und histologische Anzeichen für eine Abstoßung. Mit einer niedrig dosierten Langzeit-Immunsuppression mit Cyclosporin A wurde nach kombinierter Applikation von RT1.B2 bei 43 % der Empfängertiere eine Transplantatlangzeitfunktion beobachtet (Tab. 4.6). Am Tag 40 post transplantationem wurde bei Tieren, die CsA und RT1.B2 erhielten, keine RT1.B2-reaktiven T-Lymphozyten im indirekten Proliferations-Assay nachgewiesen, während alloreaktive RT1.D2-spezifische T-Lymphozyten weiterhin vorhanden waren – ein möglicher Hinweis darauf, dass die Abstoßung von Dünndarmtransplantaten an das Vorhandensein RT1.B2-reaktiver T-Lymphozyten gebunden ist.

## 6 Diskussion

---

### 6.1 Wege der Allo-Antigenerkennung

Nach Organübertragung wird die Transplantatabstoßung sowohl durch den direkten als auch den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung (Abb. 1) eingeleitet (Sherman LA und Chattopadhyay S, 1993; Watschinger B et al., 1994; Liu et al., 1993). In beiden Fällen ist das Vorhandensein alloreaktiver T-Lymphozyten Voraussetzung, um die Transplantatabstoßung auszulösen (Fangmann J et al., 1994; Gallon L et al., 1995). So sind etwa T-Zell-defiziente Mäuse nicht in der Lage, ein zuvor transplantiertes allogenes Organ abzustößen (Bradley JA, Sarawar SR et al., 1992; Bolton EM et al., 1989). T-Lymphozyten können zwischen selbst (autolog) und fremd (allogen) unterscheiden. Beim direkten Weg der Allo-Antigenerkennung erkennen T-Lymphozyten ganze Allo-MHC-Moleküle des Spenders (Lechler RI et al., 1990, 1991). Dem indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung liegt die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor von Empfänger-T-Lymphozyten und einem Allopeptid auf dem Empfänger-MHC II-Komplex einer antigenpräsentierenden Zelle zu Grunde (Krensky AM et al., 1990).

Mit dem indirekten T-Lymphozytenproliferations-Assay wurde in dieser Arbeit ein Assay eingesetzt, mit dem *in vivo* aktivierte T-Lymphozyten *in vitro* nachzuweisen sind; vorausgesetzt das antigene Peptid wird zur Restimulierung eingesetzt. Zuvor *in vivo* durch Immunisierung mit synthetischen Peptiden aktivierte Allopeptid-reaktive T-Lymphozyten werden im indirekten Proliferationsassay reaktiviert und somit nachweisbar. Der indirekte Proliferationsassay eignet sich somit auch, um nach Transplantation alloreaktive T-Lymphozyten nachzuweisen.

Der direkte und indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung hat für verschiedene Phasen der Abstoßung eine unterschiedliche Bedeutung. So liegt die Zahl der über den direkten Weg der Allo-Antigenerkennung aktivierten T-Lymphozyten direkt nach Transplantation um das 10- bis 100-Fache höher als die Zahl der T-

Lymphozyten, die über den indirekten Weg aktiviert werden (Lombardi G und Lechler R, 1991). Deshalb wird der direkte Weg der Allo-Antigenerkennung auch in erster Linie für die akute Abstoßung verantwortlich gemacht (Bradley JA et al., 1992; Benichou G et al., 1992). Voraussetzung für diesen Weg sind sogenannte *passenger leukocytes* – Antigen-präsentierende Zellen des Spenders – da nur sie über das entscheidende kostimulatorische Signal für eine T-Zell-Aktivierung verfügen (Hornick PI et al., 1998). Während der frühen Phase nach der Transplantation sind diese Spender-Leukozyten, die mit dem Transplantat übertragen werden, vorhanden. Diese werden jedoch im Laufe der Zeit durch Empfänger-Leukozyten ersetzt (Lechler RI und Batchelor JR, 1982), wodurch der direkte Weg der Allo-Antigenerkennung in den Hintergrund tritt (Larsen CP et al., 1990). Der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung soll die chronische Abstoßung dominieren (Braun YM et al., 1993; Sayegh MH und Carpenter CB, 1996).

In dieser Arbeit wird für das Rattenmodell gezeigt, dass der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung bereits an der akuten Abstoßung beteiligt ist. Die prä- und intraoperative Applikation relevanter synthetischer Peptide fördert die Bildung alloreaktiver T-Lymphozyten und somit die Transplantatabstoßung. Dies wurde auch für die klinische Situation beobachtet (Liu Z et al., 1996). Der Nachweis alloreaktiver T-Lymphozyten an Tag 20 und 40 in nicht immunisierten Empfängertieren unterstreicht die dominante Rolle des indirekten Weges der Allo-Antigenerkennung in der spät-akuten und chronischen Abstoßung (Suciufoca N et al 1991).

## **6.2 Modulation der Immunantwort durch synthetische Allopeptide**

Synthetische Allopeptide (sowohl MHC-Klasse I und -Klasse II) beeinflussen *in vivo* die Immunantwort vielfältig (Waaga AM et al., 1999). Die Peptide wirken dabei über unterschiedliche Mechanismen.

Sogenannte Allotrap-Peptide, hierbei handelt es sich um immunregulierende Sequenzen aus der  $\alpha$ 1-Helix des Spender MHC-Klasse I-Moleküls, verhindern die Differenzierung von NK- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (Clayberger C and Krensky AM, 1995). Es handelt sich hierbei allerdings nicht um spezifische Immuntherapeutika, da grundsätzlich sämtliche zytotoxischen T-Lymphozyten in ihren Reaktionen gehemmt werden. In Kombination mit einer niedrig dosierten Immunsuppression mit CsA wurde mit den Allotrap-Peptiden die Ausbildung von Toleranz, also einer antigen-spezifisch induzierten Nichtreaktivität, nach Transplantation erreicht (Nisco S et al., 1994; Buelow R et al., 1995). Durch Applikation von Allotrap vor bzw. nach Dünndarmtransplantation wurde das Transplantatüberleben signifikant verlängert (Willetts IE et al., 1997).

Spenderspezifische Allopeptide können über den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung immunmodulierend wirken (Sayegh MH und Krensky AM, 1996). Dabei kommt *in vivo* dem Thymus eine wesentliche Rolle zu (Remuzzi G et al., 1995). So wurde durch intrathymische Injektion löslicher MHC-Klasse I-Peptide des Spenders im Rattenmodell Toleranz induziert (Sayegh MH et al., 1993; Oluwole et al., 1994). Als wesentlicher Mechanismus wurde die Induktion von T-Zell-Anergie identifiziert. Zudem wurden eine thymusabhängige Induktionsphase und eine thymusunabhängige Erhaltungsphase beobachtet (Sayegh MH, Perico N et al., 1994). Auch die orale Applikation immunogener Peptide erzeugt Toleranz (Sayegh MH et al., 1992).

Eine Suppression der indirekten Allo-Antigenerkennung durch Peptide kann durch Blockade des MHC-Moleküls oder des T-Zell-Rezeptors erfolgen (Colovai AI et al., 1996). Durch Injektion nicht-immunogener MHC-Klasse II-Peptide gelang es, MHC-Moleküle zu blockieren, da diese Peptide mit den „echten“ Antigenen um den Platz in der Rezeptortasche des MHC-Moleküls konkurrieren und letztere verdrängen. Hierdurch verhinderten sie eine T-Zell-Aktivierung (Guery JC et al., 1992). Peptid-Analoga – modifizierte Peptide, bei denen einzelne Aminosäuren ausgetauscht wurden, die essentiell für die T-Zell-Bindung sind, sogenannte „altered peptide ligands“ – wirken als TCR-Antago-

nisten und unterbinden so den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung (Colovai AI et al., 1997; Frasca L et al., 2000).

Eine weitere Strategie zur Verhinderung der Transplantatabstoßung ist die Induktion sogenannter „high zone tolerance“ (Critchfield JM et al., 1994): Durch die hoch konzentrierte Applikation synthetischer Peptide, die dem immundominanten Epitop des Spender-MHC-Moleküls entsprechen, kommt es nach einer vorübergehenden T-Zell-Aktivierung zur Induktion von Apoptose in diesen Lymphozyten (Webb S et al., 1990).

Die in dieser Arbeit untersuchten Peptide RT1.B2 und RT1.D2 hatten im Rattenmodell nach Injektion in den Thymus zur Transplantattoleranz des Empfängers nach Nierentransplantation geführt (Waaga AM et al., 1999). Die subkutane Injektion dieser Peptide löste *in vivo* eine T-Zell-Proliferation aus, deren Auswirkungen nach Dünndarmtransplantation im Rattenmodell WF → LEW untersucht wurde. Grundsätzlich ist für das Ausmaß der Immunantwort nach Transplantation die Inkompatibilität zwischen Spender- und Empfänger-MHC ausschlaggebend. Das sich zum Empfängerantigen in 2 Aminosäurepositionen unterscheidende RT1.D2 war in unseren Versuchen auch deutlich immunogener als das Peptid RT1.B2, welches nur in einer Aminosäureposition vom Empfängerantigen abweicht.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die durch Immunisierung generierten alloreaktiven T-Lymphozyten durch das Dünndarmtransplantat restimuliert werden (Otto et al., 2002). Hiermit korrelieren unsere Beobachtungen, dass die Applikation der spenderspezifischen Peptide die akute Transplantatabstoßung – ohne die gleichzeitige Gabe einer Immunsuppression – beschleunigt; in besonderem Maße wenn das immunogenere Peptid RT1.D2 verabreicht wurde. Entsprechende Beobachtungen wurden auch nach Herz- (Vella JP et al., 1999) und Nierentransplantation (Lenhard SM et al., 2002) in Rattenmodellen gemacht.



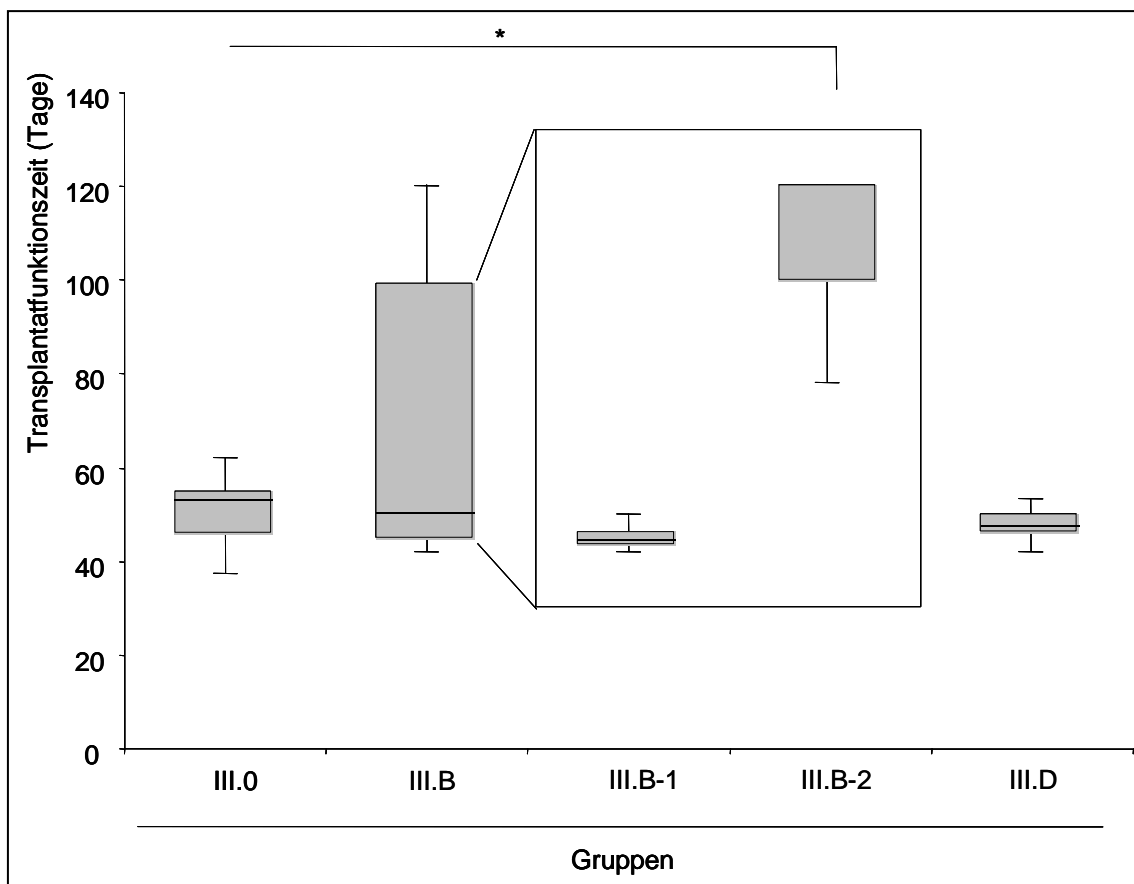
Eine der „high zone tolerance“ entsprechende Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten, insbesondere nach Immunisierung mit dem immunogeneren Peptid RT1.D2, wurde nicht beobachtet. Selbst unter Immunsuppression waren am Tag 40 nach Transplantation noch RT1.D2-reaktive T-Lymphozyten nachweisbar. Es ist zu diskutieren, ob die verwendeten Peptidkonzentrationen für eine Erzeugung einer derartigen Toleranz zu niedrig gewählt wurden. Da die Applikation von RT1.D2 sogar noch zu kürzeren Transplantatüberlebenszeiten führte als die Applikation des weniger immunogenen RT1.B2, wurde in dieser Arbeit auf eine niedrig dosierte Immunsuppression zur Elimination der durch Immunisierung generierten alloreaktiven T-Lymphozyten fokussiert.

### **6.3 Kombiniertes Einsatz von Peptiden und Cyclosporin A**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Allopeptid RT1.B2 in Kombination mit einer niedrig dosierten und auf 30 Tage begrenzten Immunsuppression mit Cyclosporin A das Transplantatüberleben nach Dünndarmtransplantation signifikant verlängert (Abb. 6.1). Hierbei ist anzumerken, dass die Transplantatfunktionszeiten der mit RT1.B2 behandelten Empfängertiere sehr heterogen waren (Tab. 4.4, Abb. 4.7): Drei der sieben Tiere wiesen Transplantatfunktionszeiten von über 78 Tagen (1 Tier) bis 120 Tagen (2 Tiere) auf; wobei im Vorfeld die Versuchsdauer auf 120 Tage begrenzt wurde. Im Gegensatz dazu wiesen vier der sieben Tiere eine Transplantatfunktionszeit von unter 50 Tagen auf. RT1.B2 und CsA scheinen synergistisch zu wirken: Durch die Immunisierung mit dem Peptid werden alloreaktive T-Lymphozyten *in vivo* (mit Spezifität für RT1.B2) generiert, die durch das Dünndarmtransplantat restimuliert werden und mittels CsA eliminiert werden.

Die wesentliche Wirkung von CsA beruht auf einer Inhibition von Calcineurin durch Komplexbildung, was die Proliferation naiver T-Lymphozyten verhindert (Liu J et al., 1991). Außerdem spielt CsA eine direkte Rolle beim programmierten Zelltod reifer Lymphozyten (Andjelic S et al., 1997; Shibasaki F et al., 1995). Im Gegensatz dazu belegen Daten die Unfähigkeit von CsA, Apoptose in aktivierten T-Lymphozyten auszulösen. Vielmehr wird angenommen, dass die

T-Lymphozyten nicht weiter proliferieren und in ihrer Funktion „ruhig“ gestellt werden (Strauss G et al., 2002). Inwieweit CsA den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung beeinflusst, wird kontrovers diskutiert: Sawyer et al. (1993) postulierten, dass CsA in zuvor immunisierten Ratten nicht in der Lage ist, die Funktion von T-Helferzellen bei der Antikörperproduktion zu hemmen. Auf der anderen Seite zeigten Clerici et al. (1990), dass die indirekte Allo-Antigenerkennung empfindlicher durch CsA gestört werden kann als die direkte. Weitere Daten belegen, dass CsA auch die Funktion Antigen-präsentierender Zellen beeinflusst, u.a. ihre Reifung und Zytokinproduktion hemmt (Tajima K et al., 2003).



**Abb. 6.1: Graphische Darstellung der Transplantatfunktionszeiten für die Versuchsgruppe III.** Mit dem Allopeptid RT1.B2 immunisierte Tiere (III.B-2) profitierten eindeutig von der Langzeit-Immunsuppression mit CsA. Siehe auch Tab. 4.4 und Abb. 4.7.

Erst durch die Kombination von RT1.B2 und CsA wurde eine Verlängerung des Transplantatüberlebens erzielt. Die alleinige Applikation von RT1.B2 beschleunigt die Abstoßung sogar noch. Ähnliche Beobachtungen wurden nach spenderspezifischer Bluttransfusion (*donor specific blood transfusion*; DST) gemacht: DST allein führt zu einer Beschleunigung der Transplantatabstoßung, jedoch in Kombination mit CsA wurde das Transplantatüberleben deutlich verlängert (Santiago SF et al., 1994; Tweedle JR et al., 1996). Diese immunmodulatorische Wirkung der DST beruht ebenfalls auf dem indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung (Kishimoto K et al., 2004).

Das verlängerte Transplantatüberleben scheint insbesondere in Zusammenhang mit der Abwesenheit RT1.B2-reaktiver T-Lymphozyten zu stehen, da diese im indirekten Proliferationsassay an Tag 40 post transplantationem in zuvor mit RT1.B2 sensibilisierten und anschließend CsA-behandelten Tieren nicht mehr nachzuweisen sind. Vella et al. (1997) untersuchten die spät-akute Abstoßung an einem Herztransplantationsmodell mit 3-wöchiger CsA-Behandlung. Eine Peptidapplikation fand nicht statt. Nach Ende der Immunsuppression erfolgte bei allen Tieren eine Transplantatabstoßung. In diesem Stadium wurden Proliferationsassays mit denselben Peptiden durchgeführt, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Hierbei wurde eine deutlich geringere Proliferation gegenüber dem Peptid RT1.B2 beobachtet als gegenüber RT1.D2. Ein mögliches Indiz, dass CsA insbesondere auf RT1.B2-reaktive Lymphozyten wirkt.

#### **6.4 Grundlagen der Toleranzentwicklung**

Toleranz wird als Abwesenheit einer Immunantwort auf definierte Antigene bei gleichzeitiger Reaktivität gegenüber anderen Antigenen definiert (Schwartz, 1993). „Echte“ Toleranz ist selten; meistens wird mit diesem Begriff eine verminderte Immunantwort beschrieben. Auch impliziert Langzeitüberleben nicht notwendigerweise Toleranz, da Transplantate mit Langzeitfunktion nicht unbedingt eine normale Funktion und Morphologie aufweisen (Sayegh MH and

Carpenter CB, 1997). Einige Studien belegen den Zusammenhang zwischen Toleranzentwicklung und dem Ausbleiben einer chronischen Transplantatabstoßung (Orloff MS et al., 1995; Shin YT et al., 1995; Murase NM et al., 1995).

Auch in den detaillierten histologischen Untersuchungen dieser Arbeit fanden sich bei Tieren mit Langzeitüberleben, welche allesamt eine Immunisierung mit dem Peptid RT1.B2 erhalten hatten, allenfalls dezente Anzeichen einer chronischen Transplantatabstoßung; ein Tier war gänzlich unauffällig.

Eine Toleranzprüfung gegenüber WF-Spenderantigenen kann durch DTH-Reaktion oder den indirekten Proliferationsassay erfolgen. Beide Verfahren spiegeln die T-Zell-Reaktivität eines Organismus gegenüber Allo-Antigenen wider (Sayegh MH, Perico N et al., 1994; Hancock WW et al., 1994), wobei Toleranz mit Nicht-Reaktivität gegenüber einem Allo-Antigen einhergeht. Weitere Prüfungen der Toleranz bestehen in der Akzeptanz weiterer Organe desselben Spenders (z.B. Herz, Haut) bei erhaltener Immunkompetenz gegenüber anderen Spendern (Chowdhury NC et al., 1993).

In dieser Arbeit wurde der indirekte Proliferationsassay zum Nachweis alloreaktiver Gedächtnis T-Lymphozyten verwendet. Vierzig Tage nach Transplantation waren in Tieren, die zuvor mit RT1.B2 immunisiert worden waren, keine RT1.B2-reaktiven T-Lymphozyten mehr nachweisbar, wohingegen RT1.D2-reaktive T-Lymphozyten weiterhin nachgewiesen wurden. Das verlängerte Transplantatüberleben scheint somit in einem unmittelbaren Zusammenhang mit der Abwesenheit RT1.B2-reaktiver T-Lymphozyten zu stehen. Die wichtige Frage, ob diese T-Lymphozyten wirklich nicht mehr vorhanden sind, oder ob sie funktionsuntüchtig geworden sind, bleibt zu klären. Nach Sayegh und Carpenter (1997) kann erworbene Toleranz auf drei verschiedenen Mechanismen beruhen: T-Zell-Anergie, T-Zell-Depletion und einer Immundeviation – d.h. einem Wechsel vom Th1- zum Th2-Zytokinmuster (Sayegh MH, Akalin E et al., 1995; Shirwan H et al., 1998).

Die Kombination aus Peptid RT1.B2, einem spenderspezifischen Antigen, das die Transplantatabstoßung beschleunigt, und konventioneller Immunsuppression führt zu einem deutlich verlängerten Transplantatüberleben bei ca. 43 % der Empfängertiere. Hierzu sind deutlich geringere CsA-Dosen notwendig als bei einem alleinigen Einsatz von CsA. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten unterstützen die Vermutung, dass diese Kombination entweder die allopeptidspezifischen T-Lymphozyten selektiv zerstört (z.B. durch Induktion von Apoptose) oder dauerhaft inhibiert.

Die Daten dieser Arbeit zeigen zudem, dass durch Immunisierung mit Allopeptiden antigenspezifische T-Lymphozyten induziert werden, die an der Transplantatabstoßung beteiligt sind.

## 7 Ausblick

---

Die starke Immunogenität des Dünndarms provoziert eine überaus starke akute Abstoßung, die starke Immunsuppression erfordert. Die gegenwärtig in der Klinik eingesetzten Immunsuppressiva werden dem Anspruch einer selektiven und spezifischen Hemmung der gegen Antigene des Transplantates gerichteten Immunantwort nicht gerecht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Applikation spenderspezifischer MHC-Klasse II-Peptide der Weg der indirekten Allo-Antigenerkennung beeinflusst werden kann – mit dem Erfolg einer verlängerten Transplantatfunktion.

In dieser Arbeit wurde mit RT1.B2 in Kombination mit einer niedrig dosierten konventionellen Immunsuppression eine erfolgreiche Immunmodulation nach Transplantation durchgeführt: Trotz geringerer Dosis an Immunsuppressivum wurde in 43 % der Fälle eine Verlängerung der Transplantatfunktion erreicht. Des Weiteren wurde gezeigt, dass ab Tag 40 nach Transplantation die Proliferation RT1.B2-spezifischer T-Lymphozyten ausblieb. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, auf welchen Mechanismen (Apoptose, Anergie) dieses Ausbleiben einer T-Zellproliferation beruht.

Da ausschließlich die Abwesenheit RT1.B2-spezifischer T-Lymphozyten mit einer verlängerten Transplantatfunktionszeit korreliert, stellt sich die Frage nach der Ursache für diese Beobachtung. Anscheinend sind nicht sämtliche Allo-Antigene an der Transplantatabstoßung beteiligt. In diesem Bereich sind, ohne Frage, weitere Untersuchungen von großer Bedeutung, um zu verstehen, warum nicht sämtliche Allo-Antigene für die T-Lymphozyten vermittelte Abstoßung relevant sind. Auch ist wichtig zu untersuchen, ob diese Strategie auch für andere Spender-Empfänger-Kombinationen erfolgreich ist.

## 8 Zusammenfassung

---

T-Lymphozyten des Empfängers können über den direkten oder indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung Spender-MHC-Moleküle (Allo-Antigene) erkennen. Hieraufhin werden diese aktiviert und können anschließend eine Transplantatabstoßung auslösen. In der Klinik wird die Transplantatabstoßung durch den Einsatz von Immunsuppressiva verhindert. Ein großer Nachteil ist, dass sich die Immunsuppression auf sämtliche T-Lymphozyten gleichsam auswirkt - unabhängig von ihrer Spezifität. Somit sind nicht nur T-Lymphozyten betroffen, die Allo-Antigene erkennen, sondern auch solche, die für die Abwehr von Infektionen notwendig sind bzw. die Entstehung von Malignomen verhindern. Dies korreliert mit klinischen Beobachtungen, wonach organtransplantierte Patienten ein höheres Risiko aufweisen, an schweren Infektionen oder Neoplasien zu erkranken. Wünschenswert wäre somit eine selektive Suppression ausschließlich der an der Abstoßung beteiligten T-Lymphozyten.

In dieser Arbeit wurde die biologische Funktion von zwei synthetischen Allopeptid-Antigenen, RT1.B2 und RT1.D2, untersucht. Die Peptide, die mit bestimmten Sequenzen von MHC-Klasse II-Molekülen des Spenders identisch sind, aktivieren über den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung alloreaktive T-Lymphozyten des Empfängers. RT1.D2 erwies sich dabei als das immunogenere Peptid. Wurden die Empfänger vor Transplantation mit diesen Peptiden immunisiert, so verkürzte sich die Transplantatfunktionszeit um 2 Tage. Nicht-immunisierte Empfängertiere wiesen eine Transplantatfunktionszeit von  $5,3 \pm 0,5$  Tage auf, nach Immunisierung mit RT1.B2 bzw. RT1.D2 verringerte sich die Transplantatfunktionszeit 3,5 bzw. 3,3 Tage. Die Verkürzung der Transplantatfunktionszeit durch Immunisierung mit Allopeptiden wurde auch nach einer kurzfristigen Immunsuppression mit CsA beobachtet. Im Gegensatz dazu führte eine Verlängerung der Immunsuppression auf 30 Tage nach Transplantation zu einer Verlängerung der Transplantatfunktionszeit, wenn zuvor mit dem Allopeptid RT1.B2 immunisiert wurde.

Das Konzept dieser Arbeit war, die prä- und intraoperative Applikation von Allopeptiden, die nachweislich an der Transplantatabstoßung durch Induktion alloreaktiver T-Lymphozyten beteiligt sind, mit einer niedrig-dosierten Immunsuppression zu kombinieren, die alleine nicht in der Lage ist, die spät-akute Abstoßung des Dünndarmtransplantates zu verhindern, um somit gezielt die alloreaktiven T-Lymphozyten zu eliminieren. Dies gelang nach Applikation des weniger immunogenen Allopeptides RT1.B2 in Kombination mit niedrig dosiertem CsA: Nahezu die Hälfte der so behandelten Tiere wies nach Dünndarmtransplantation eine Transplantatlangzeitfunktion auf. Histologische Untersuchungen der Transplantate zeigten keine bzw. allenfalls leichte Veränderungen im Sinne einer chronischen Transplantatabstoßung. Auf zellulärer Ebene konnten in derartig behandelten Tieren mittels indirektem Proliferationsassay an Tag 40 nach Transplantation keine RT1.B2-reaktiven T-Lymphozyten mehr nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass die Kombination aus Immunisierung mit dem Peptid RT1.B2 und einer niedrig dosierten Immunsuppression zu einer selektiven Immunsuppression führt, bei der die RT1.B2-spezifischen T-Lymphozyten inhibiert bzw. depletiert werden.



## 9 Literaturverzeichnis

---

- Abramovicz D, Wissing KM, Broeders N (2000): Nephrotoxicity of calcineurin inhibitors: new therapeutic approaches. *Transplantation Proceedings*, 32:3S-5S
- Andjelic S, Khanna A, Suthanthiran M, Nikolic-Zugic J (1997): Intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation and cyclosporin A synergistically induce TGF-beta 1-mediated apoptosis in lymphocytes. *Journal of Immunology*, 158: 2527-2534
- Auchincloss Jr H, Sultan H (1996): Antigen processing and presentation in transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 8: 681-687
- Bechstein WO (2000): Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transplant International*, 13(5):313-326
- Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE (1992): Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *Journal of Experimental Medicine*, 175: 305-308
- Bolton EM, Gracie JA, Briggs JD, Kampinga J, Bradley JA (1989): Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *Journal of Experimental Medicine*, 169:1931-1946
- Bradley JA, Mowat AM, Bolton EM (1992): Processed MHC class I alloantigen as the stimulus for CD4<sup>+</sup> T-cell dependent antibody-mediated graft rejection. *Immunology Today*, 13:434-438
- Bradley JA, Sarawar SR, Porteous C, Wood PJ, Card S, Ager A, Bolton EM, Bell EB (1992): Allograft rejection in CD4<sup>+</sup> T cell-reconstituted athymic nude rats – the nonessential role of host-derived CD8<sup>+</sup> cells. *Transplantation*, 53:477-482
- Braun MY, McCormack A, Webb G, Batchelor RJ (1993): Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4<sup>+</sup> T cells activated by the direct pathway of sensitization. *Transplantation*, 55:177-182
- Buelow R, Veyron P, Clayberger C, Pouletty P, Touraine JL (1995): Prolongation of skin allograft survival in mice following administration of ALLOTRAP. *Transplantation*, 59:455-460
- Chowdhury NC, Fawwaz RA, Oluwole SF (1993): Induction of donor-specific tolerance to rat cardiac and small bowel allografts by intrathymic inoculation of donor T-cells. *The Journal of Surgical Research*, 54:368-374
- Clayberger C, Krensky AM (1995): Immunosuppressive peptides corresponding to MHC class I sequences. *Current Opinion in Immunology*, 7:644-648

- Clerici M, Shearer GM (1990): Differential sensitivity of human T helper cell pathways by in vitro exposure to cyclosporine A. *Journal of Immunology*, 144:2480-2485
- Colovai AI, Liu Z, Harris PE, Cortesini R, Suci-Foca N (1997): Allopeptide-specific T cell reactivity altered by peptide analogs. *Journal of Immunology*, 158:48-54
- Colovai AI, Molajoni ER, Cortesini R, Suci-Foca N (1996): New approaches to specific immunomodulation in transplantation. *International Review of Immunology*, 13:161-172
- Critchfield JM, Racke MK, Zuniga-Pflucker JC, Canella B, Raine CS, Goverman J, Lenardo MJ (1994): T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 263:1139-1143
- Deltz E, Schroeder PR, Gundlach M, Hansmann ML, Leimenstoll G (1990): Successful clinical small-bowel transplantation. *Transplantation Proceedings*, 22: 250-251
- Deltz E und Thiede A: Microsurgical technique of small-intestine transplantation. In: Thiede A, Deltz E, Engemann R, Hamelmann H, Hrsg. (1985): *Microsurgical model in rats for transplantation research*, S.51-55, Springer, Berlin
- Fändrich F, Zhu X, Schröder J, Dresske B, Henne-Bruns D, Oswald H, Zavazava N (1999): Different in vivo tolerogenicity of MHC class I peptides. *Journal of Leukocyte Biology*, 65: 16-27
- Fangmann J, Dalchau R, Sawyer GJ, Priestley CA, Fabre JW (1992): T cell recognition of donor major histocompatibility complex class I peptides during allograft rejection. *European Journal of Immunology*, 22:1525-1530
- Frasca L, Tamir A, Jurcevic S, Marinari B, Monizio A, Sorrentino R, Carbonari M, Piccolella E, Lechler RI, Lombardi G (2000): Peptide analogues as a strategy to induce tolerance in T cells with indirect allospecificity. *Transplantation*, 70:631-640
- Gallon L, Watschinger B, Murphy B, Akalin E, Sayegh MH, Carpenter CB (1995): 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*, 59:612-616
- Ghobrial RR, Hamashima T, Wang ME, Wang M, Stepkowski SM, Kahan BD (1996): Induction of transplantation tolerance by chimeric donor/recipient class I RT1.Aa molecules. *Transplantation*, 62: 1002-1010
- Gorantla VS, Barker JH, Jones JW, Prabhune K, Maldonado C, Granger MD (2000): Immunosuppressive agents in transplantation: mechanisms of action and current anti-rejection strategies. *Microsurgery*, 20: 420-429

- Guery JC, Sette A, Leighton J, Dragomir A, Adorini L (1992): Selektive immunosuppression by administration of major histocompatibility complex (MHC) class II-binding peptides. Evidence for in vivo MHC blockade preventing T cell activation. *Journal of Experimental Medicine*, 175: 1345-1352
- Hancock WW, Khoury SJ, Carpenter CB, Sayegh MH (1994): Differential effects of oral versus intrathymic administration of polymorphic major histocompatibility complex class II peptides on mononuclear and endothelial cell activation and cytokine expression during a delayed-type hypersensitivity response. *American Journal of Pathology*, 144: 1149-1158
- Hess AD, Esa AH, Colombani PM (1988): Mechanisms of action of cyclosporine: effect on cells of the immune system and on subcellular events in T cell activation. *Transplantation Proceedings*, 20(2), Suppl 2:29-40
- Hornick PI, Mason PD, Yacoub MH, Rose ML, Batchelor R, Lechler RI (1998): Assessment of the contribution that direct allorecognition makes to the progression of chronic cardiac transplant rejection in humans. *Circulation*, 97:1257-63
- Isakov N, Scholz W, Altman A (1987): Effect of cyclosporine A on early stages of T-cell activation. *Transplantation Proceedings*, 19(1): 1186-1188
- Kishimoto K, Yuan X, Auchincloss H Jr, Sharpe AH, Mandelbrot DA, Sayegh MH (2004): Mechanism of action of donor-specific transfusion in introducing tolerance: role of donor MHC molecules, donor co-stimulatory molecules, and indirect antigen presentation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15:2423-2428
- Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P (1990): T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *New England Journal of Medicine*, 322:510-517
- Land W (1996): Das chronische Transplantatversagen. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 138:119-123
- Land W (1995): Wie ist die Transplantatarteriosklerose zu verhüten? *Therapiewoche* 34:1982-1989
- Langrehr JM, Banner B, Lee KKW, Schraut WH (1993): Clinical course, morphology, and treatment of chronically rejecting small bowel allografts. *Transplantation*, 55:242-250
- Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM (1990): Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *Journal of Experimental Medicine*, 171:307-314

- Lechler RI und Batchelor JR (1982): Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 155: 31-41
- Lechler RI, Batchelor JR (1982): Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *Journal of Experimental Medicine*, 156:1835-1841
- Lechler RI, Batchelor JR, Lombardi G(1991): The relationship between MHC restricted and allospecific T cell recognition. *Immunology Letters*, 29:41-50
- Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH (1990): The molecular basis of alloreactivity. *Immunology Today*, 11:83-88
- Lee KKW, Stangl MJ, Todo S, Langrehr JM, Hoffman A, Starzl TE, Schraut WH (1990): Comparison of short term immunosuppressive therapy with cyclosporine and FK506 in small bowel transplantation. *Transplantation Proceedings*, 22:1485-1486
- Lee RS, Yamada K, Houser SL, Womer KL, Maloney ME, Rose HS, Sayegh MH, Madsen JC (2001): Indirect allorecognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:3276-3281
- Lenhard SM, Gasser M, Otto C, Kist-van Holthe JE, Navarro E, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A, Waaga AM (2002): Influence of class II MHC-specific allopeptides via the indirect pathway of allorecognition in experimental small bowel and kidney transplantation. *Graft*, 5:182-186
- Lillehei RC, Goott B, Miller FA (1959): Homografts of the small bowel. *Surgical Forum*, 10:197-201
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66:807-815
- Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, Reed EF, Fisher PE, Mancini D, Rose EA, Cortesini R, Michler RE, Suci-Foca N (1996): Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *Journal of Clinical Investigation*, 98:1150-1157
- Liu Z, Sun YK, Xi YP, Maffei A, Reed E, Harris P, Suci-Foca N (1993): Contribution of direct and indirect recognition pathways to T Cell alloreactivity. *Journal of Experimental Medicine*, 177:1643-1650
- Lombardi G, Lechler R (1991): The molecular basis of allorecognition of major histocompatibility complex molecules by T lymphocytes. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 27:7-14

- Monchik GJ, Russell PS (1971): Transplantation of small bowel in the rat. *Surgery*, 70:693-702
- Murase NM, Starzl TE, Tanabe M, Fujisaki S, Miyazawa H, Ye Q, Delaney CP, Fung JJ, Demetris AJ (1995): Variable chimerism, graft-versus-host disease and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from Lewis to Brown Norway rats. *Transplantation*, 60:158-171
- Murphy B, Krensky AM (1999): HLA-derived peptides as novel immunomodulatory therapeutics. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10:1346-1355
- Nisco S, Vries P, Hoyt G, Lyu SC, Farfan F, Pouletty P, Krensky AM, Clayberger C (1994): Induction of allograft tolerance in rats by an HLA class-I-derived peptide and cyclosporine A. *Journal of Immunology*, 152:3786-3792
- Oluwole SF, Chowdhury NC, Jin M, Hardy MA (1994): Induction of transplantation tolerance in rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of allogenic soluble peptides. *Transplantation*, 56:1523-1527
- Oluwole SF, Jin MX, Chowdhury NC, Engelstad K, Ohajekwe OA, James T (1995): Induction of peripheral tolerance by intrathymic inoculation of soluble alloantigens: evidence for the role of hostantigen-presenting cells and suppressor cell mechanism. *Cellular Immunology*, 162:33-41
- Opelz G und Döhler B (2004): Lymphomas after solid organ Transplantation: a collaborative transplant study report. *American Journal of Transplantation*, 4 (2): 222-230
- Orloff MS, Demara EM, Coppage ML, Leong N, Fallon MA, Sickel J, Zuo XJ, Prehn J, Jordan SC (1995): Prevention of chronic rejection and graft arteriosclerosis by tolerance induction. *Transplantation*, 59:282-288
- Petersen P, Schneeberger H, Schleibner S, Illner WD, Hofmann GO, Scholz S, Albert ED, Land W (1995): HLA-mismatching and short/long-term outcome of cadaveric renal allografts: large single center data confirm large multicenter analyses. *Transplantation Proceedings*, 27:651-652
- Remuzzi G, Perico N, Carpenter CB, Sayegh MH (1995): The thymic way to transplantation tolerance. *Journal of the American Society of Nephrology*, 5:1639-1646
- Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway Jr. CA (1991): Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*, 353: 622-627
- Rogers NJ und Lechler RI (2001): Allorecognition. *American Journal of Transplantation*, 2001; 1: 97-102

- Rosemurgy AS, Schraut WH (1986): Small bowel allografts. Sequence of histologic changes in acute and chronic rejection. *The American Journal of Surgery*, 151:470-475
- Santiago SF, Fukuzawa M, Azuma T, Nezu R, Imura K, Takagi Y, Okada A (1994): The effect of donor-specific transfusion and cyclosporin A on small bowel transplantation in the rat. *Surgery Today*, 24:429-434
- Sawyer GJ, Dalchau R, Fabre JW (1993): Indirect T cell allorecognition: a cyclosporin A resistant pathway for T cell help for antibody production to donor MHC antigens. *Transplantation Immunology*, 1:77-81
- Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Turka LA (1995): CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge *in vivo* inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *Journal of Experimental Medicine*, 181:1869-1874
- Sayegh MH, Carpenter CB (1996): Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *International Review of Immunology*, 13:221-229
- Sayegh MH, Carpenter CB (1997): Tolerance and chronic rejection. *Kidney International*, 51, Suppl. 58:S11-S14
- Sayegh MH, Khoury SK, Hancock WW, Weiner HL, Carpenter CB (1992): Induction of immunity and oral tolerance with polymorphic class II MHC allopeptides in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:7762-7766
- Sayegh MH, Krensky AM (1996): Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides. *Kidney International*, 49; Suppl. 53: 13-20
- Sayegh MH, Perico N, Gallon L, Imberti O, Hancock WW, Remuzzi G, Carpenter CB (1994): Mechanisms of acquired thymic unresponsiveness to renal allografts. *Transplantation*, 58: 125-132
- Sayegh MH, Perico N, Imbert I, Hancock WW, Carpenter CB, Remuzzi G (1993): Thymic recognition of class II MHC allopeptides induces donor specific unresponsiveness to renal allografts. *Transplantation*, 56:461-465
- Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB (1994): Mechanisms of T-cell recognition of alloantigen. *Transplantation*, 57 (9):1295-1302
- Schwartz RH: Immunological tolerance. In: Paul WE (Hrsg.): *Fundamental Immunology*. New York: Raven Press, Ltd; 1993. S. 677-731
- Sherman LA, Chattopadhyay S (1993): The molecular basis of allorecognition. *Annual Review of Immunology* 11:385-402
- Shibasaki F, McKeon F (1995): Calcineurin functions in Ca(2+) -activated cell death in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 131:735-743

- Shin YT, Adams DH, Wyner LR, Akalin E, Sayegh MH, Karnovsky MJ (1995): Intrathymic tolerance in the Lewis to F344 chronic cardiac allograft rejection model. *Transplantation*, 59:1647-1653
- Shirwan H, Barwari L, Khan NS (1998): Predominant expression of T helper 2 cytokines and altered expression of T helper 1 cytokines in long-term allograft survival induced by intrathymic immune modulation with donor class I major histocompatibility complex peptides. *Transplantation*, 66:1802-1809
- Shoskes DA, Wood KJ (1994): Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunology Today*, 15: 32-38
- Steele DJR, Laufer TM, Smiley ST, Ando Y, Grusby MJ, Glimcher LH, Auchincloss Jr. H (1996): Two levels of help for B cell allo-antibody production. *Journal of Experimental Medicine*, 183: 699-703
- Strauss G, Osen W, Debatin KM (2002): Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clinical and Experimental Immunology*, 128:255-266
- Suciu-Foca N, Reed E, Marboe C, Xi XP, Sun YK, Ho E, Rose E, Reemtsma K, King DW (1991): Role of anti-HLA antibodies in heart transplantation. *Transplantation*, 51:716-724
- Tajima K, Amakawa R, Ito T, Miyaji M, Takebayashi M, Fukuhara S (2003): Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets. *Immunology*, 108:312-328
- Tweedle JR, Middleton SE, Marshall HE, Bradley JA, Bolton EM (1996): Alloantibody and intragraft cellular response to MHC class I-disparate kidney allografts in recipients tolerized by donor-specific transfusion and cyclosporine. *Transplantation*, 62:23-29
- Vella JP, Magee C, Vos L, Womer K, Rennke H, Carpenter CB, Hancock W, Sayegh MH (1999): Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation*, 67:1523-1532
- Vella JP, Vos L, Carpenter CB, Sayegh MH (1997): Role of indirect allo-recognition in experimental late acute rejection. *Transplantation*, 64:1823-1828
- Via CS, Tsokos GC, Stocks NI, Clerici M, Shearer GM (1990): Human in vitro allogeneic responses. Demonstration of three pathways of T helper cell activation. *Journal of Immunology* 144:2524-2528
- Waaga AM, Murphy B, Sayegh M (1999): Major histocompatibility complex-derived peptides as novel forms of immunosuppression. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 4:211-218

- Watschinger B, Gallon L, Carpenter CB, Sayegh MH (1994): Mechanisms of allorecognition. Recognition by in vivo-primed T cells of specific major histocompatibility complex polymorphisms presented as peptides by responder antigen-presenting cells. *Transplantation*, 57:572-576
- Webb S, Morris C, Sprent J (1990): Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell*, 63:1249-1256
- Whitelegg A, Barber LD (2003): The structural basis of T-cell allorecognition. *Tissue Antigens*, 63: 101-108
- Willetts IE, Tam PK, Morris PJ, Dallman MJ (1997): Treatment with an HLA-peptide and cyclosporine A prolongs rat allograft survival. *Journal of Pediatric Surgery* 32:469-472
- Zavazava N, Fändrich F, Zhu X, Freese A, Behrens D, Yoo-Ott KA (2000): Oral feeding of an immunodominant MHC donor-derived synthetic class I peptide prolongs graft survival of heterotopic cardiac allografts in a high-responder rat strain combination. *Journal of Leukocyte Biology*, 67: 793-800



## Abkürzungsverzeichnis

---

Abb.	Abbildung(en)
Ak	Antikörper
Con A	Concanavalin A
cpm	counts per minute
CsA	Cyclosporin A (Sandimmun ®)
DC	Dendritische Zelle(n)
DD	Dünndarm
DDTx	Dünndarmtransplantation
DTH	Delayed Type Hypersensitivity (Verzögerte zelluläre Typ-IV-Reaktion)
FCS	Fötales Kälberserum
FK 506	Tacrolimus (Prograf ®)
HLA	Human Leukocyte Antigen (Haupthistokompatibilitätskomplex beim Menschen)
KG	Körpergewicht
LEW	Lewis (Rattenstamm)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (Natural Killer Cells)
OP	Operation
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
Tab.	Tabelle(n)
TCR	T-cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tx	Transplantation
WF	Wistar Furth (Rattenstamm)

## Danksagung

---

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

Herrn **Prof. Dr. med. C.-T. Germer**, Ärztlicher Direktor des Zentrums Operative Medizin und Direktor der Chirurgischen Klinik I der Universität Würzburg, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit auch nach so geraumer Zeit fertig stellen zu können.

Herrn **Prof. Dr. med. W. Timmermann**, Chefarzt der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie und Ärztlicher Direktor des Allgemeinen Krankenhauses Hagen, danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. rer. nat. C. Otto**, Arbeitsgruppe für experimentelle Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, für die detaillierte Projektplanung und seine freundliche aber bestimmte Hilfestellung bei der Durchführung des Versuchsvorhabens, seine große Diskussionsbereitschaft, seine anhaltende Motivierung - vor allem aber für seine fast endlose Geduld bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

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

Für die Operation zahlreicher Versuchstiere gilt mein besonderer Dank den Mitarbeiterinnen des transplantations-immunologischen Labors, Frau **A. Gebert** und Frau **J. Grimmer**. Frau **N. Martens** danke ich für ihre Unterstützung beim Erlernen der vielfältigen experimentellen Techniken und ihre Mithilfe bei wichtigen Experimentalserien.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinem Ehemann und meinen Eltern, die mir durch ihre vielfältige Unterstützung und ihren steten Glauben an mich die Fertigstellung dieser Promotion ermöglichten.