

Aus der chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Chirurgische Klinik I
Direktor: Professor Dr. med. A. Thiede

**Untersuchungen zum immunbiologischen Effekt spender-spezifischer
MHC-Klasse-II-Peptide nach experimenteller Nieren- und
Dünndarmtransplantation**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Miriam Lenhard
aus Schwerte

Würzburg, Mai 2003

Referent: Prof. Dr. med. W. Timmermann

Koreferentin: Prof. Dr. rer. nat. A.M. Waaga-Gasser

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Februar 2005

Die Promovendin ist Ärztin.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Fragestellung | 6 |
| 3. Material und Methoden | 7 |
| 3.1 Versuchstiere | 7 |
| 3.1.1 Tierhaltung | |
| 3.1.2 Versuchsgruppen | |
| 3.1.3 Immunsuppression mit Cyclosporin A (CsA) | |
| 3.2 Allo-MHC-Klasse-II-Peptide | 9 |
| 3.2.1 Herstellung | |
| 3.2.2 Sensibilisierung der Tiere | |
| 3.2.3 DTH-Reaktion | |
| 3.3 Mikrochirurgische Techniken | 10 |
| 3.3.1 Technik der Dünndarmtransplantation | |
| 3.3.2 Technik der Nierentransplantation | |
| 3.4 Zellisolierung | 11 |
| 3.4.1 Zellisolierung von Lymphozyten aus Lymphknoten und Milz | |
| 3.4.2 Isolierung dendritischer Milzzellen | |
| 3.4.3 Isolierung CD4 ⁺ T-Lymphozyten | |
| 3.4.3.1 CD8 ⁺ -Depletion | |
| 3.4.3.2 CD4 ⁺ -Selektion | |
| 3.5 In vivo- und in vitro-Testsysteme | 13 |
| 3.5.1 Indirekter Proliferations-Assay | |
| 3.5.2 Direkter Proliferations-Assay | |
| 3.5.3 Enzyme linked-immunosorbent Assay, ELISA | |
| 3.5.4 Durchflusszytometrische Analyse | |
| 3.5.5 RNase Protektions-Assay | |
| 3.5.6 Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten-Reaktion, RT-PCR | |
| 3.6 Histologie | 16 |
| 3.7 Statistische Auswertung | 17 |
| 4. Ergebnisse | 18 |
| 4.1 Charakterisierung der peptidinduzierten T-Zell-Proliferation | 18 |
| 4.1.1 Indirekter Proliferations-Assay | |
| 4.1.2 Direkter Proliferations-Assay | |
| 4.1.3 Durchflusszytometrische Analyse | |

| | |
|--|----|
| 4.2 Charakterisierung peptidinduzierter Effekte nach Transplantation | 28 |
| 4.2.1 Überlebensdaten | 29 |
| 4.2.1.1 Überlebensdaten nach präoperativer Immunisierung | |
| 4.2.1.2 Überlebensdaten nach postoperativer Immunisierung | |
| 4.2.2 In vivo- und in vitro-Tests zum Langzeitüberleben nach Dünndarmtransplantation | 33 |
| 4.2.2.1 In vivo-Tests zum Langzeitüberleben | |
| 4.2.2.2 In vitro-Tests zum Langzeitüberleben | |
| 4.2.2.3 Zytokinexpression im Transplantat toleranter Tiere | |
| 4.2.2.4 HE-Histologie zum Toleranzstadium nach Dünndarmtransplantation | |
| 4.2.3 T-Zell-Reaktivität nach Peptidapplikation | 38 |
| 4.2.3.1 T-Zell-Reaktivität nach Dünndarmtransplantation | |
| 4.2.3.2 T-Zell-Reaktivität nach Nierentransplantation | |
| 4.2.4 Zytokinexpression nach Peptidapplikation | 42 |
| 4.2.4.1 Zytokinexpression bei akuter Abstoßung nach Nierentransplantation | |
| 4.2.4.2 Zytokinexpression bei akuter Abstoßung nach Dünndarmtransplantation | |
| 4.2.5 HE-Histologie nach Peptidapplikation | 47 |
| 4.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse | 48 |
| | |
| 5. Beantwortung der Fragen | 49 |
| 6. Diskussion | 52 |
| 6.1 Wege der Allo-Antigenerkennung | |
| 6.2 Modulation der Immunantwort durch synthetische MHC-Peptide | |
| 6.3 Grundlagen der Toleranzentwicklung | |
| 6.4 Einfluss von Zytokinen auf das Transplantatüberleben | |
| 6.5 Ausblick | |
| | |
| 7. Zusammenfassung | 59 |
| 8. Literaturverzeichnis | 60 |
| 9. Anhang | 74 |
| 9.1 Abkürzungsverzeichnis | |
| Danksagung | |
| Lebenslauf | |

1. Einleitung

Die Transplantation ist eine seit Jahren etablierte Behandlungsmethode bei einer Vielzahl von Organerkrankungen. Der Ersatz erkrankter Organe geschieht nicht nur in lebensbedrohlichen Situationen, z.B. bei terminalem Herz- oder Leberversagen, sondern auch wenn alternative Therapieverfahren erfolglos bleiben oder auf Dauer keine Heilung erzielen. In diese Kategorie zur Verbesserung der Lebensqualität gehören u.a. die Nieren- und Dünndarmtransplantation [1-3].

Am Beispiel der Nierentransplantation können die durch eine Operation gewonnenen Vorteile in verschiedener Hinsicht veranschaulicht werden: So kann etwa eine erneute Eingliederung der Patienten in das Arbeitsleben erreicht werden, während eine zeitintensive Dialyse dies häufig nicht zulässt. Zudem erhöht sich die Überlebensprognose der Patienten nach einer Nierentransplantation [4]. Darüber hinaus bringt eine Nierentransplantation – vergleicht man sie mit den Kosten einer Dialyse – auch erhebliche wirtschaftliche Vorteile [5]. Für Patienten mit Kurzdarmsyndrom kann die Dünndarmtransplantation eine Alternative zum herkömmlichen Therapieverfahren sein. Bei Kindern sind die Ursachen häufig intestinale Fehlbildungen, Gangliosien oder nekrotisierende Enterokolitiden. Bei Erwachsenen können chronische Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, Traumata oder Tumorbefall nach notwendigen Dünndarmresektionen zum Kurzdarmsyndrom führen [6,7]. Solche Patienten werden parenteral ernährt. Die Folgen einer solchen, auch als TPN (“total parenteral nutrition“) bezeichneten Ernährung sind Katheterinfekte, Sepsis und Thromben. Die Langzeittherapie kann zu Leberversagen und Malnutrition führen [8-11].

Die Erfolge der Transplantationsmedizin beruhen in erster Linie darauf, dass es gelang, die durch das fremde Organ ausgelöste Immunantwort zu inhibieren. Dies erfolgt mittels Immunsuppressiva wie Cyclosporin (CsA) oder Tacrolimus (FK 506). Weitere Faktoren, die die Ergebnisse von Organtransplantationen verbessert haben sind Optimierung der chirurgischen Transplantationstechniken [12], Fortschritte in der Gewebetypisierung [13-15] und Senkung der Infektrate [16] während der Operation.

Die Transplantatabstoßung wird in Abhängigkeit vom Zeitpunkt ihres Auftretens in eine akute und in eine chronische Phase eingeteilt [17]. Eine Verringerung der Zahl akuter Abstoßungsepisoden verringert die Gefahr der Entwicklung der chronischen Abstoßung [18]. Insbesondere durch Cyclosporin und Takrolimus, die die akute Abstoßung verhindern [19,20], wurde das Transplantat- und somit auch das Patientenüberleben verbessert [1]. Aktuell liegt nach Nieren-, Herz- oder Lebertransplantation das 1-Jahres-Transplantaüberleben bei nahezu 95% [21]. Die Einführung von CsA in die Klinik steigerte nach Nierentransplantation das 1-Jahres-Transplantatüberleben von 15 auf 85% [22].

Andererseits müssen bei der Anwendung dieser potenten Immunsuppressiva deren Nebenwirkungen und die Nachteile einer unspezifischen generellen Immunsuppression in Kauf genommen werden [23-25]. Transplantierte Patienten haben somit ein größeres Risiko, an opportunistischen Infekten (z.B. Pneumonien) zu erkranken oder Neoplasien [26], vor allem der Haut und der lymphatischen Organe, zu entwickeln. Weitere Faktoren sind die Organtoxizität (z.B. Neuro- und Nephrotoxizität) der Immunsuppressiva [27,28]. Im Gegensatz zu der guten Kontrolle der akuten Abstoßung stellen die gegenwärtig verfügbaren Immunsuppressiva für die chronische Abstoßung keine befriedigende Lösung dar [29].

Um diese Komplikationen zu minimieren und gleichzeitig bessere Langzeitergebnisse zu erzielen, ist die Aufklärung der für die Transplantatabstoßung verantwortlichen zellulären und molekularen Mechanismen unerlässlich [30]. Ein besseres Verstehen der immunologischen Vorgänge bei der Transplantatabstoßung ist die Voraussetzung für die Entwicklung einer Therapie, die einer spezifischen Unterdrückung des Immunsystems mit Toleranz des Spenderorgans gerecht wird [31-33].

Durch variable Oberflächenmoleküle (Moleküle des sog. Haupthistokompatibilitätskomplexes, MHC) ist das Immunsystem fähig, zwischen selbst und fremd zu unterscheiden. Genetisch unterschiedliche Individuen derselben Spezies bezeichnet man als allogene. Allogene MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche des Transplantates

verursachen die Abstoßungsreaktion, nachdem sie von den T-Lymphozyten des Empfängers als fremd erkannt werden [34-36], sofern dieser nicht immunsupprimiert ist [20]. Je geringer die Unterschiede beim HLA-Mismatch sind, desto besser sind die Transplantationsergebnisse [37-39]. Nach Transplantation wird die Stimulierung von T-Lymphozyten durch Allo-MHC-Moleküle als Allo-Reaktivität beschrieben [40-42]. Die Mechanismen, die der Abstoßung zu Grunde liegen, konzentrieren sich auf die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen, wobei hier MHC-Moleküle, prozessierte Allo-MHC-Peptide und T-Zell-Rezeptor interagieren (Abb. 1) [43,44].

Nach Transplantation spielen zwei verschiedene Mechanismen der T-Zell-Aktivierung eine Rolle, der direkte und der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung [45] [46]. Der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung beschreibt den im Organismus üblichen Weg der Antigenerkennung [36,47,48]. Hierbei erkennen $CD4^+$ T-Lymphozyten die prozessierten Peptide eines Allo-Antigens, die ihnen über eigene antigenpräsentierende Zellen zusammen mit MHC-Klasse-II-Molekülen dargestellt werden [49]. Im Gegensatz zum indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung werden auf dem direkten Weg der Allo-Antigenerkennung ganze MHC-Moleküle auf der Oberfläche von Spender-Leukozyten, sogenannte „passenger-Leukozyten“, erkannt, die bei der Transplantation zusammen mit dem Organ übertragen werden [50]. Gerade unmittelbar nach der Transplantation spielt die direkte Allo-Antigenerkennung eine wichtige Rolle, da auf der Oberfläche von „passenger-Leukozyten“ sowohl MHC-Klasse-I- als auch MHC-Klasse-II-Moleküle erkannt werden; $CD4^+$ -Helfer T-Lymphozyten binden direkt an MHC-Klasse-II-, $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten an MHC-Klasse-I-Moleküle [51]. Vom Zeitpunkt der Transplantation nimmt der Anteil der „passenger-Leukozyten“ kontinuierlich ab, wodurch die Bedeutung des direkten Wegs der Allo-Antigenerkennung in den Hintergrund tritt.

Beide Wege der Allo-Antigenerkennung ziehen eine Aktivierung von T-Lymphozyten nach sich [52], die in einer Immunantwort gegen das Transplantat mündet [53,54] (Abb. 1).

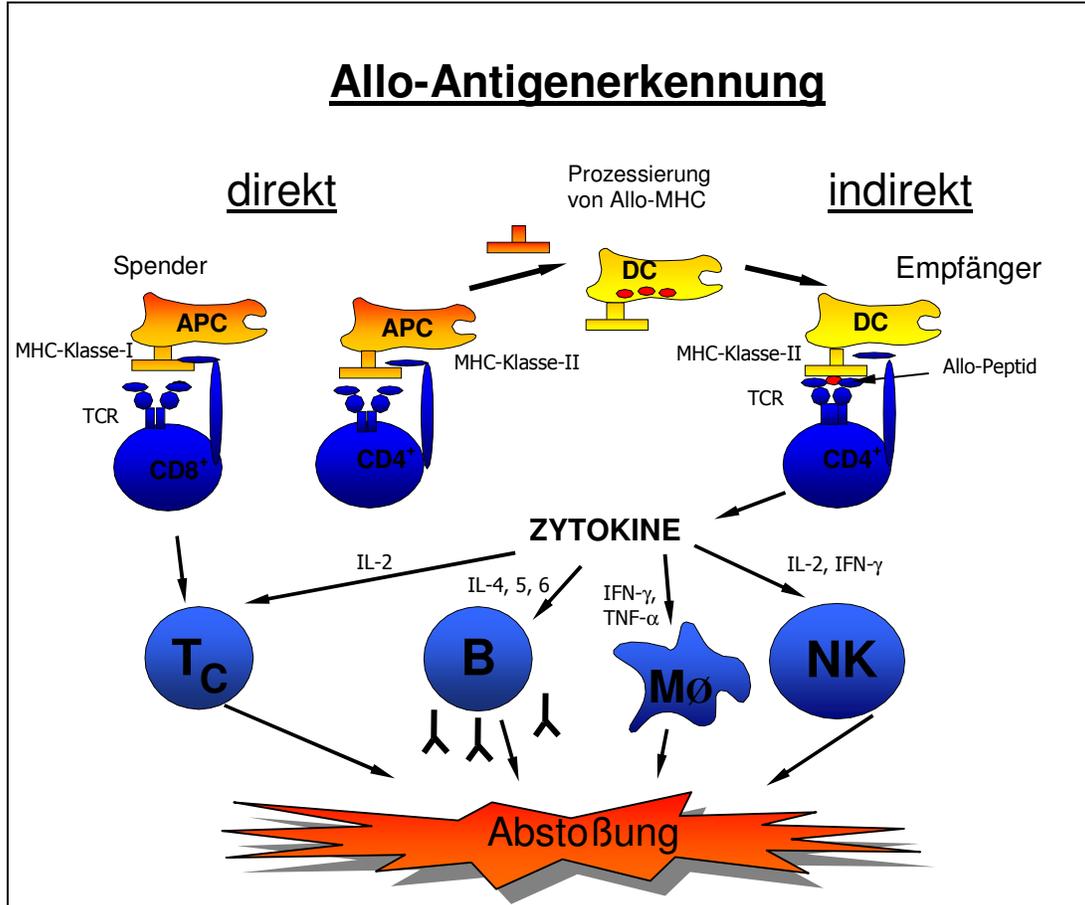


Abb.1 T-Zell-Aktivierung über den direkten und indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung mit folgender zytokingesteuerter Aktivierung sekundärer Effektor-Zellen, wie B-Lymphozyten, zytotoxische T-Lymphozyten (T_c), Makrophagen (Mφ) und natürliche Killerzellen (NK)

Auf diesem Weg können sich z.B. naive CD4⁺ T-Lymphozyten zu Th₁- oder Th₂-Zellen entwickeln [55], die sich durch ein jeweils charakteristisches Zytokinmuster unterscheiden [56,57]. Durch die selektive Bildung von Th₁-Zellen wird eine zellvermittelte Immunität ausgelöst, wohingegen Th₂-Zellen eine humorale Immunantwort induzieren. Typische Zytokine der Th₁-Antwort sind IL-2 und IFN-γ, die zytotoxische T-Lymphozyten zur Differenzierung und weiteren Aktivierung von Killerzellen und Makrophagen anregen [58,59]. Als charakteristische Zytokine der Th₂-Antwort werden IL-4, -5, -10 und -13 angesehen [58]. Ungeklärt ist, ob die akute Abstoßung auf eine Th₁-dominierte Immunreaktionen und die Toleranzentwicklung auf

eine Th₂-dominierte Immunreaktionen zurückzuführen ist; ebenso bleibt die Bedeutung von Th₁- und Th₂-Antwort bei der Entwicklung der chronischen Abstoßung und im Stadium der Toleranz weiterhin ungeklärt [56,58,60-62]. Deshalb wurde hier auch die Zytokinexpression nach Transplantation untersucht.

In dieser Arbeit wird die Interaktion von MHC-Klasse-II-Komplex, Allo-Peptiden und T-Zell-Rezeptor untersucht. Hierzu wurden verschiedene synthetische Peptide hergestellt, die dem MHC-Komplex in ihrer Sequenz auf einer Länge von ca. 25 Aminosäuren entsprechen und in ihrer Länge auch „natürlich“ prozessierten Peptiden gleichen [33]. Appliziert man diese Peptide einem Allo-Empfänger, wird der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung stimuliert [63]. Diesem indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung wird vielfach im Gegensatz zum direkten Weg eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der noch nicht kontrollierbaren chronischen Abstoßung zugeschrieben [50,64-66].

Aufgabe dieser Arbeit ist es, immunologische Effekte nach der Transplantation organübergreifend zu analysieren. Hierzu wurde der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung sowohl nach Nieren- als auch nach Dünndarmtransplantation untersucht. Besondere Aufmerksamkeit galt der Beeinflussung der Transplantatabstoßung durch Peptidapplikation sowohl prä- als auch postoperativ. Hierbei wurde vor allem die spezifische T-Zell-Reaktivität und die Zytokinexpression in verschiedenen Stadien der Transplantatabstoßung analysiert. Erst der Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Transplantationsmodellen erlaubt, organübergreifende Charakteristika der allopeptid-induzierten Abstoßungsreaktion zu beschreiben. Außerdem ist der Dünndarm unter den Organtransplantaten das Organ mit der größten Anzahl lymphatischer Zellen, die für komplexe immunologische Reaktionen verantwortlich sind. Die Untersuchung des indirekten Weges der Allo-Antigenerkennung führt zu einem besseren Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen bei der Transplantatabstoßung und ist Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapieformen mit dem hohen Anspruch der selektiven Modulation des Immunsystems und der Induktion von Transplantattoleranz [67-70].

2. Fragestellung

Im einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Können synthetische MHC-Klasse-II-Peptide T-Lymphozyten aktivieren? Können sie auch zur Detektion spezifischer T-Lymphozyten im indirekten Proliferations-Assay eingesetzt werden?
2. Beeinflussen synthetische MHC-Klasse-II-Moleküle das Transplantat-Überleben? Kommt somit dem indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung in der akuten Abstoßung eine Bedeutung zu?
3. Wodurch wird das Stadium der akuten Abstoßung nach Applikation von Peptid RT1.B^uβ (20-44) oder RT1.D^uβ (20-44) charakterisiert?
4. Ist das Stadium der Toleranz durch eine veränderte T-Zell-Reaktivität oder eine veränderte Zytokin-Expression charakterisiert?
5. Unterscheiden sich die peptidinduzierten Effekte nach Dünndarmtransplantation von denen nach Nierentransplantation? Welche Rolle spielt das transplantierte Organ?

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten aus kontrollierten Inzuchtstämmen. Folgende Tiere (Charles River, Bad Sulzfeld), deren MHC-Haplotyp hinter der Stammabkürzung in Klammern angegeben ist, wurden für diese Studie verwendet: Lewis (LEW, RT1^l), Wistar Furth (WF, RT1^u), Brown Norway (BN, RT1ⁿ).

Zum Zeitpunkt der Transplantation wogen die sechs bis acht Wochen alten Ratten 180 bis 230 Gramm. Nach der Transplantation wurden die Tiere in Laminar-Flow-Schränken (Fa. Scanbur, Dänemark) in Makrolon®-Käfigen mit Sägemehlstreu bei Wasser und Altromin®-Pressfutter ad libitum gehalten; die Haltungstemperatur betrug 22±2°C, die relative Luftfeuchtigkeit 50-60%, der Hell-Dunkel-Rhythmus 12 Stunden. Alle transplantierten Tiere wurden täglich begutachtet; hierbei wurden Gewicht, Körperhaltung, Vigilanz sowie das Aussehen des Abdomens, der Nase und der Pfoten festgehalten. Besonderes Augenmerk wurde auf eine mögliche Abstoßungsreaktion gelegt. Bei einer einmaligen Gewichtsabnahme nach Transplantation von mehr als 20 % oder einer kontinuierlichen Abnahme von 2 % pro Tag an sechs aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Versuche abgebrochen.

3.1.2 Versuchsgruppen

Die allogene Dünndarm (DDTx)- und Nierentransplantation (NTx) erfolgte in der Stammkombination WF auf LEW. Als Kontrollgruppen dienten neben den nicht peptid-behandelten allogenen Kontrollen (WF auf LEW) auch naive, d.h. nicht transplantierte Tiere sowie syngen (LEW auf LEW) transplantierte Tiere, die unbehandelt blieben.

Tabelle 3.1.2 gibt eine Übersicht der verschiedenen Versuchsgruppen.

Tab. 3.1.2 Übersicht der Versuchsgruppen nach Transplantation; DDTx = Dünndarmtransplantation, NTx = Nierentransplantation; Tag -7 = 7 Tage präoperativ (prae OP); Tage 20 und 27 = Tage 20 und 27 postoperativ (post OP)

| <i>Gruppe</i> | <i>Transplantat</i> | <i>CsA s.c. (mg/kg/KG)</i> | <i>Peptid am Tag</i> | <i>Tierzahl (n)</i> |
|---------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| I, II | DDTx | --- | -7, 0 | 9 |
| III, IV | DDTx | 20 | 20, 27 | 12 |
| V | DDTx | --- | --- | 4 |
| VI | DDTx | 20 | --- | 6 |
| I, II | NTx | --- | -7, 0 | 10 |
| III, IV | NTx | 5 | 20, 27 | 9 |
| V | NTx | --- | --- | 6 |
| VI | NTx | 5 | ---- | 6 |

3.1.3 Immunsuppression mit CsA

Cyclosporin (Sandimmun®, Novartis, Nürnberg) besitzt eine selektive Wirkung auf Lymphozyten und besonders auf T-Lymphozyten. Die Synthesehemmung von Interleukin-2 in T-Helferzellen steht dabei im Vordergrund [71]. Cyclosporin (CsA) wird zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen nach Organ- und Knochenmarktransplantation eingesetzt [72]. Die Immunsuppression nach Dünndarm- und Nierentransplantation wurde der Immunogenität der transplantierten Organe angepasst: Tiere, die das weniger immunogene Nierentransplantat erhielten, wurden mit CsA in niedrigerer Dosis behandelt (Abb. 3.1.2, NTx: Gruppe (Gp) III, IV: 5 mg/kg/KG von Tag 0 - 4 vs DDTx: Gp III, IV: 20 mg/kg/KG, Tage 0 – 13).

Neben der Immunsuppression wurden die Tiere der Gruppen I - IV mit synthetischen Allo-MHC-Klasse-II-Peptiden behandelt. Die Peptid-Applikation erfolgte für die Gruppen III und IV an den Tagen 20 und 27 postoperativ, für die Gruppen I und II an den Tagen -7 und 0, d.h. präoperativ und am Operationstag. Das Allo-MHC-Klasse-II-Peptid wurde bei der ersten Applikation in einer TiterMax®-Emulsion (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), bei der zweiten in isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius, Bad Homburg) intraperitoneal verabreicht.

3.2 MHC-spezifische Allo-Peptide

3.2.1 Herstellung

Die Allo-MHC-Klasse-II-Peptide RT1.D^u und RT1.B^u wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert; der Reinheitsgrad > 95 % wurde durch RP-HPLC getestet und die Masse durch MALDI Massenspektrometrie verifiziert.

Tab. 3.2.1 gibt eine Übersicht der verwendeten synthetisch hergestellten Allo-MHC-Klasse-II-Peptide [17]; die Aminosäuresequenz ist im Ein-Buchstaben-Code vom aminoterminalen (N) zum carboxyterminalen (C) Ende aufgeführt.

| <i>Peptid-Bezeichnung</i> | <i>Aminosäure-position</i> | <i>Aminosäuresequenz</i> |
|---------------------------|----------------------------|--|
| RT1.D ^u (D2) | (20-44) | N-GTNRVRL L ARLIYNREEYAR F DSDV-C |
| RT1.D ^u (D3) | (39-62) | N-R F DSDVGEYRAVTELGRPSAEYR N -C |
| RT1.B ^u (B2) | (20-44) | N-GT Q RIR N VIR Y IYNREEY L R Y DSDV-C |
| RT1.B ^u (B3) | (39-62) | N-R Y DSDVGEYRAVTELGRPSAEY F N-C |

Die Peptide entsprechen den Aminosäuren der hypervariablen Region der RT1.D^u- und RT1.B^u- β -Kette der Wistar Furth-Ratte. Die Peptide aus RT1.D^u sind äquivalent mit der Region DR des humanen MHC-Komplexes, RT1.B^u Peptide mit der DQ-Region des Menschen [33]. Es wurde je ein Peptid aus RT1.D^u und RT1.B^u mit den Aminosäurepositionen 20-44, die im weiteren mit RT1.D2 und RT1.B2 bezeichnet werden, und je eines aus den Aminosäurepositionen 39-64, im weiteren RT1.D3 und RT1.B3 genannt, synthetisiert. Peptid RT1.D2 und RT1.B2 unterscheiden sich in acht Aminosäuren (Positionen 22, 24, 26, 27, 28, 30, 38, 40), wobei die größten Abweichungen am N-terminalen Ende auf den Positionen 22 bis 30 liegen. Hingegen gibt es zwischen Peptid RT1.D3 und RT1.B3 nur zwei Aminosäure-Abweichungen (Positionen 40, 61) - je eine am N-terminalen und eine am C-terminalen Ende. Sämtliche synthetisierten Peptide wurden in sterilem PBS-Puffer (PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,2 mM Na₂PO₄ x 2H₂O, 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7,2) gelöst und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

3.2.2 Sensibilisierung der Tiere

Naive LEW-Ratten wurden durch subkutane Injektion in die Hinterpfoten (50 µg/Pfote) mit jeweils einem der vier synthetisierten Allo-MHC-Klasse-II-Peptide oder mit einem Gemisch der vier Peptide als TiterMax[®]-Emulsion (TiterMax:Peptidlösung = 1:1) sensibilisiert. Sieben Tage nach Sensibilisierung wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten aus dem Tier präpariert und hieraus die Lymphozyten isoliert.

3.2.3 DTH-Reaktion

Zur Überprüfung der DTH-Antwort wurden Lew-Ratten mit langzeitfunktionellen Dünndarmtransplantaten in ein Ohr 10 µg des Peptids RT1.D2 oder RT1.B2 injiziert sowie in das andere Ohr isotonische Kochsalzlösung als Kontrolle. Durch einen unbeteiligten Drittuntersucher wurde direkt nach der Injektion und 48 Stunden später mit Hilfe einer Mikrometerschraube (Oditest[®], Kroeplin) die Ohrendicke ($\times 10^{-1}$ mm) abgelesen.

3.3 Mikrochirurgische Techniken

Die mikrochirurgische Operation wurde mittels eines Operationsmikroskops (Typ Mentor C, Wild M605, Leica, Fa. Codman, Herbruggen, Schweiz) mit 10- bis 25-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Tiere wurden unter Isofluorannarkose (Abbott, Wiesbaden) bei aseptischen, nicht sterilen Bedingungen operiert.

3.3.1 Technik der Dünndarmtransplantation

Die orthotope Dünndarmtransplantation wurde nach dem von Deltz und Thiede beschriebenen Modell [73] in modifizierter Form durchgeführt. Es wurden Duodenum und Ileum vom Treitzschen Band bis 1 cm vor die Ileocoecalklappe zusammen mit Mesenterium, mesenterialen Lymphknoten, Arteria mesenterica und Aortenmanschette orthotop transplantiert. WF-Spendertiere wurden 24 Stunden, Lew-Empfängertiere 12 Stunden vor Operation nüchtern gesetzt [74]. In dieser Stammkombination verstarben die Tiere ohne Immunsuppression innerhalb der ersten zehn Tage nach Transplantation.

3.3.2 Technik der Nierentransplantation

LEW-Empfänger-Ratten wurden primär bilateral nephrektomiert. Anschließend wurde das Spenderorgan heterotop transplantiert. Ebenso wie beim Dünndarmmodell wurde das Transplantat von einem MHC-inkompatiblen WF-Spendertier übertragen. In dieser Stammkombination verstarben die Tiere bei fehlender Immunsuppression innerhalb von zwei Wochen an den Folgen einer akuten Transplantatabstoßung mit Oligoanurie [75].

3.4 Zellisolierung

3.4.1 Isolierung von Lymphozyten aus Lymphknoten und Milz

Nach primärer Peptidsensibilisierung der Tiere in die Hinterpfoten wurden sieben Tage nach Injektion die Lymphozyten aus den drainierenden poplitealen Lymphknoten gewonnen. Bei transplantierten Tieren wurden die Lymphozyten aus der Milz und den peripheren Lymphknoten isoliert. Die Organe wurden entweder im Stadium der akuten Abstoßung oder der Toleranz explantiert.

Milz und Lymphknoten wurden mit einem Stempel durch ein Stahlsieb desintegriert. Die so gewonnenen Zellen wurden anschließend bei 400 x g zentrifugiert (Sigma 4K10) und mit RPMI 1640 Medium gewaschen, bestehend aus 10 %igem fötalen Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol, 5 mM HEPES, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat (= Kompletmedium; alle Reagenzien von Life Technologies GmbH, Karlsruhe). Anschließend wurden die Erythrozyten lysiert, die verbliebenen Zellen nochmals gewaschen und gezählt [76].

3.4.2 Isolierung dendritischer Milzzellen

Die Milz einer naiven Lew-Ratte wurde durch ein steriles Stahlsieb desintegriert, zweimal gewaschen, lysiert und in Kompletmedium (s.o.) resuspendiert. Die Zellen wurden in eine Zellkulturschale (Nunc, Wiesbaden) überführt und für eine Stunde im Brutschrank (NUAIRE™ TS Autoflow CO₂ Jacketed Incubator) inkubiert (37°C, 6 % CO₂). Anschließend wurde der Überstand verworfen und die adhärennten Zellen über Nacht in Kompletmedium inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Zellen über 14,5 %iges Metrizamid (Cedarline, London, Ontario, Canada) geschichtet und für 13 min bei 1800 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen der Interphase wurden

aufgenommen, erneut gewaschen und gezählt. Die so gewonnene DC-Population zeigte eine Reinheit von 50-60 %. Dies wurde durch durchflußzytometrische Analyse mittels mAK gegen MHC-Klasse-I- und -II-Antigene und den Ratten-DC-Marker OX-62 nachgewiesen [77,78]. 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.

3.4.3 Isolierung CD4⁺ T-Lymphozyten

Der indirekte Proliferations-Assay (3.5.1) wurde entweder mit Lymphozyten (3.4.1) oder mit durch Positivselektion aufgereinigten CD4⁺-Zellen durchgeführt.

3.4.3.1 CD8-Depletion

Die Lymphozyten wurden gewonnen und weiter aufbereitet. Zunächst wurden die Zellen mit einem anti-CD8 mAK (pro 10⁶ Zellen 0,3 μ g mAk-Lösung; Serotec, Oxford, Großbritannien) 30 min auf Eis geschüttelt und dann zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS-Puffer aufgenommen und für 15 min zusammen mit pan-anti-mAK, den Dynabeads (Zellzahl : Dynabeads = 1 : 3; Dynal, Hamburg), erneut auf Eis geschüttelt. Mit Hilfe eines Magneten (Dynal, Hamburg) wurden nun die OX8⁺-Zellen von den restlichen im Überstand verbliebenen Zellen getrennt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um alle OX8⁻-Zellen mit den Überständen zu gewinnen. Die Zellen aus dem Überstand wurden zweimal gewaschen, in PBS-Puffer aufgenommen und gezählt.

3.4.3.2 CD4-Selektion

Analog zur CD8-Depletion wurde eine Isolierung mit anti-CD5 mAK (Serotec, Oxford, GB) durchgeführt. An dieser Stelle wurde jedoch der Überstand verworfen und die mit dem Magneten isolierten Zellen weiter verwertet. Die so gewonnene Zellenpopulation, die CD8⁻ und CD5⁺ ist, entspricht bei der Ratte CD4⁺-Zellen. Um die gewonnenen Zellen von den Dynabeads zu trennen, wurden sie für 20 min bei 37°C mit DNase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) inkubiert (4,15 μ g DNase bis zu 1x10⁸ Dynabeads). Die gewonnenen Zellen wurden zweimal gewaschen, in PBS-Puffer aufgenommen und gezählt.

3.5 In vivo- und in vitro-Testsysteme

3.5.1 Indirekter Proliferations-Assay (Abb.4.1.1)

Lymphozyten oder aufgereinigte CD4⁺-Zellen aus einer immunisierten Lew-Ratte wurden in Kompletmedium in einer 96er Rundboden-Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen) kultiviert. Die Ansätze enthielten jeweils 1×10^5 Lymphozyten sowie bestrahlte LEW-DCs (1×10^4) mit 10 µg des spezifischen Peptids in einem Gesamtvolumen von 150 µl. Als negative Kontrollen dienten Ansätze mit Medium, dendritische Zellen solo, T-Lymphozyten solo und T-Lymphozyten mit dendritischen Zellen, als positive Kontrolle T-Lymphozyten mit Concanavalin A (= Con A, Sigma, Taufkirchen; in einer Konzentration von 2 mg/ml). Die Kulturplatten wurden für 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank (NUAIRE™ TS Autoflow CO₂ Jacketed Incubator) inkubiert. In den letzten sechs Stunden wurde jedem Ansatz 50 µl ³H-Thymidin (1 µCi/Ansatz; Pharmacia, Braunschweig) beigefügt und die Proliferation durch Einfrieren der Zellen gestoppt. Die DNA wurde mit einem Harvester (Pharmacia, Uppsala, Schweden) auf Filtermatten geerntet und mit einem β-Counter (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde die Radioaktivität gemessen. Die Zellproliferation in jedem Ansatz wurde anhand des ³H-Thymidin Einbaus in die DNA ermittelt. Jedes Experiment wurde in einem sechsfachen Ansatz durchgeführt und die Ergebnisse als Durchschnittswerte in Impulsen pro Minute (counts per minute, cpm) wiedergegeben.

3.5.2 Direkter Proliferations-Assay

Der direkte Proliferations-Assay unterscheidet sich vom indirekten Proliferations-Assay bezüglich der Herkunft der antigenpräsentierenden Zellen (Abb.1). Anstatt eigener LEW-DCs wurden in diesem Assay allogene dendritische Zellen von WF- oder BN-Rattenstämmen verwendet. Die sonstigen Bedingungen waren wie unter 3.5.1 beschrieben.

3.5.3 Enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA)

Die Zytokine IFN-γ, IL-2, IL-4 und IL-10 aus Zellkulturüberständen wurden im ELISA untersucht. Danach wurden die Zellkulturen wie für einen Proliferations-Assay (3.5.1) in Mikrotiterplatten angesetzt. Diese wurden bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre für 48

Stunden kultiviert. Danach wurden die Kulturüberstände entnommen und der Anteil der in den Überständen befindlichen Zytokine mit BioSource Cytoscreen™ Rat ELISA Kits (BioSource, Nivelles, Belgium) bestimmt und photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gemessen.

3.5.4 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Die in den verschiedenen Schritten der CD4⁺-Aufreinigung (siehe 3.4.3) gewonnenen Zellen wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse genauer charakterisiert. Es wurden Einfach- und Doppelfärbungen durchgeführt, wobei mit Antikörpern verschiedener Spezifität gearbeitet wurde. Es wurden sowohl direkt mit Phytoerythrin (PE) konjugierte als auch nicht konjugierte Antikörper verwendet. Für jeden Ansatz wurden 2×10^5 Zellen gefärbt. Hierfür wurden die Zellen mit einem Maus-anti-Ratte-Antikörper (Ak) (Tab. 3.5.4) für 25 min bei 4°C inkubiert. Wenn unkonjugierte Antikörper verwendet wurden, wurden diese anschließend mit einem Esel-anti-Maus PE-Sekundär-Ak markiert. Anschließend erfolgte die Blockade durch Mausnormalserum. Als zweite Färbung diente ein FITC-konjugierter Primär-Ak, welcher ebenfalls für 25 min inkubiert wurde. Die Qualität der Absättigung wurde mit einer Isotypkontrolle (IgG1 konjugiert mit FITC von Pharmingen) überprüft (nicht gezeigt).

Tab. 3.5.4 Übersicht der verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse oder die Zellisolierung mit Dynabeads

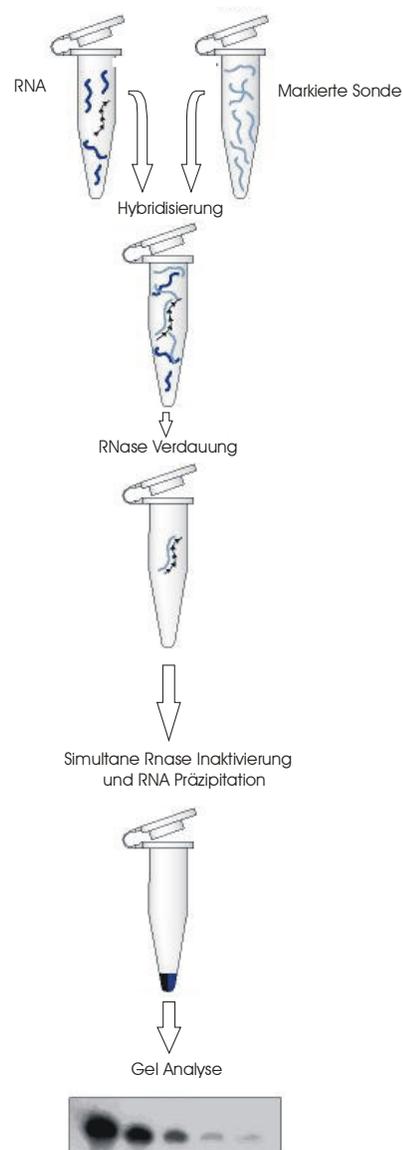
| <i>Antikörper</i> | <i>Rezeptor</i> | <i>Ziel-Zell-Populationen</i> |
|-------------------|---------------------------------|--|
| OX1 | CD45 | Leucocyte common antigen (LCA), alle hämatopoetischen Zellen |
| OX8 | CD8 | Zytotoxische T-Lymphozyten, T-Suppressorzellen (CD8 α -Kette) |
| OX19 | CD5 | nur Ratte : T-Lymphozyten |
| OX33 | CD45 RA o.A/B | LCA nur auf B Zellen |
| 341 | CD8 | Zytotoxische T-Lymphozyten, T-Suppressorzellen (CD8 β -Kette) |
| R73 | Anti TCR (α , β) | T-Lymphozyten |
| W3/25 | CD4 | T-Lymphozyten , Makrophagen-Subpopulationen |

Die Zellanalysen wurden an einem Ein-Laser-Durchflusszytometer (FACSScan, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt und die Messwerte mit Hilfe der Lysis-II-Software (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) und Win MDI (The Sripps Research

Institute) dargestellt [69]. Eine Übersicht der verwendeten Primär-Ak ist in Tab. 3.5.4 gegeben.

3.5.5 RNase Protektions-Assay

Die zu untersuchenden Transplantate wurden in kleine Stücke geschnitten und mit einem Homogenisator in RNazol™ (Fa. Qiagen, CA, USA) komplett homogenisiert. Unter Zugabe von Chloroform (Fa. Sigma, MO, USA) wurde die RNA extrahiert und anschließend mit Isopropanol (Fa. Sigma, MO, USA) präzipitiert. Ein Cocktail radioaktiv markierter $[\alpha^{32}\text{P}]$ -RNA-Sonden der Zytokine IL-2, 3, 4, 5, 6, TNF- α , β und IFN- γ wurde mit Hilfe der Zytokin-Schablone synthetisiert. Dazu wurde die Transkriptionsreaktion mit der DNA-Zytokin-„Schablone“ und radioaktiv markierten Trinukleotiden angesetzt. Nach einer Stunde Inkubation wurde DNase hinzugefügt, um die Schablone zu entfernen. Anschließend wurde die RNA-Sonde durch Natriumacetat in Ethanol (Fa. Pharmaco, NJ, USA) gefällt. Der RNase Protektions-Assay wurde in mehreren Schritten durchgeführt: Die markierte Sonde wurde mit der gewonnenen Transplantat-RNA in Hybridisierungslösung gemischt, bei 95°C denaturiert und über Nacht bei 56°C hybridisiert. Ungeschützte Ein-Strang-RNA wurde nachfolgend durch RNase-Verdau abgebaut. Nach Stoppen dieser Reaktion wurden die hergestellten Fragmente durch Ethanol gefällt, in Puffer (RPA III™ Kit, Ambion, Texas, USA) aufgenommen und bei 95°C denaturiert. Die Fragmente wurden in einem Acrylamidgel (Sequa® Gel, National Diagnostics, USA) aufgetrennt. Dieses Gel wurde



(Abb. Pharmingen, USA)

mit einem Röntgenfilm (Fa. Fuji, MA, USA) für 72 Stunden bei -80°C aufbewahrt. Abschließend wurden die Röntgenfilme eingescannt und mittels NIH-Software die Expression der jeweiligen Zytokine ausgewertet, indem die relative Schwärzung des Röntgenfilms für jedes Zytokin berechnet wurde.

Aufgrund der Komplexität der Versuche wurde der RNase-Protektions Assay nur an jeweils zwei Versuchstieren der einzelnen Gruppen durchgeführt.

Alle Produkte stammen, falls nicht anders angegeben, aus dem Maxiscript™ Kit und RPA III™ Kit der Firma Ambion® (Texas, USA). Die DNA Zytokin-,Schablone“ (rCK-1 Multi-Probe Template Set) wurde von der Firma BD Pharmingen, CA, USA hergestellt.

3.5.6 Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Zunächst wurde die Gesamt-RNA, wie unter 3.5.5 beschrieben, aus den Milz- und Lymphknoten-Zellen extrahiert. Nachfolgend wurde die cDNA mit einem RNA PCR-Kit (Applied Biosystem GmbH, Weiterstadt, Deutschland) unter Verwendung von Primern für IL-2, IL-4 und IFN- γ [79] (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) hergestellt: in einem Endvolumen von 20 μ l wurden 5 μ l RNA, 2 μ l dNTPs Mix (10 mM), 1 μ l RNase Inhibitor, 1 μ l Oligo d(T)₁₆ Primer (2,5 mM Endkonzentration), 1 μ l Reverse Transkriptase, 4 μ l dH₂O, 4 μ l MgCl₂ (25 mM) und 2 μ l 10 x PCR Puffer II inkubiert. Für die Amplifikation der RNA wurden 5 μ l cDNA, 2,5 μ l (5 μ M each) 5' und 3' Primer, 0,5 μ l Gold Taq (5 U/ μ l), 36 μ l dH₂O, 2 μ l MgCl₂ (25 mM) und 4 μ l 10x PCR-Puffer-II in einem Gesamtvolumen von 50 μ l angesetzt. Die Amplifikation fand mit einer vorgetesteten Zykluszahl in einem Gen Amp PCR System (Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2400) statt, und die Amplifikate wurden abschließend auf einem 2 %igen Agarose Gel aufgetrennt. Die Analysen wurden in Doppelproben gemessen.

3.6 H.E.- und PAS-Histologie

Die Transplantate wurden zur mikroskopischen Beurteilung formalinfixiert und anschließend mit PAS-Färbung (NTx) oder Hämatoxylin-Eosin (H.E.) (DDTx) gefärbt. Hierbei wurde der Erhalt der Organstruktur, die Gefäßproliferation sowie Art, Dichte und Lokalisation der proliferierenden Zellen beurteilt. Dem histologischen Grading

nach Dünndarmtransplantation wurden die von Rosemurgy und Schraut [80] beschriebenen Phasen zu Grunde gelegt. Die histologische Dokumentation wurde mit einem Photomikroskop (BH 2®, Fa. Olympus und Mikrophot-FXA®, Fa. Nikon) durchgeführt.

3.7 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mittels Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, 1985-1999) und SPSS 10.0.7 (SPSS Inc., 1989-1999) statistisch ausgewertet. Alle Werte werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Es kamen nur statistische Tests zur Anwendung, die nicht eine Normalverteilung der Daten voraussetzen. Anhand des Wilcoxon-Tests wurde die Signifikanz von Unterschieden abhängiger Stichproben ermittelt. Für mehrere abhängige Stichproben wurde Friedmans ANOVA als Signifikanztest angewendet. Bei Vergleichen zwischen unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ein p-Wert unter 0,05 wurde bei allen Tests als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der peptidinduzierten T-Zell-Proliferation

Da Spender-MHC-Klasse-II-Moleküle an der Transplantatabstoßung beteiligt sind, wurde die immunologische Bedeutung verschiedener Peptide, die definierte Abschnitte des MHC-Klasse-II-Moleküls des Spenders repräsentieren, untersucht. Dazu wurden verschiedene synthetische MHC-Klasse-II-Peptide in einem allogenen Ansatz auf eine T-Zell-Antwort hin überprüft. Als Testsystem diente der indirekte Proliferations-Assay (Abb. 4.1).

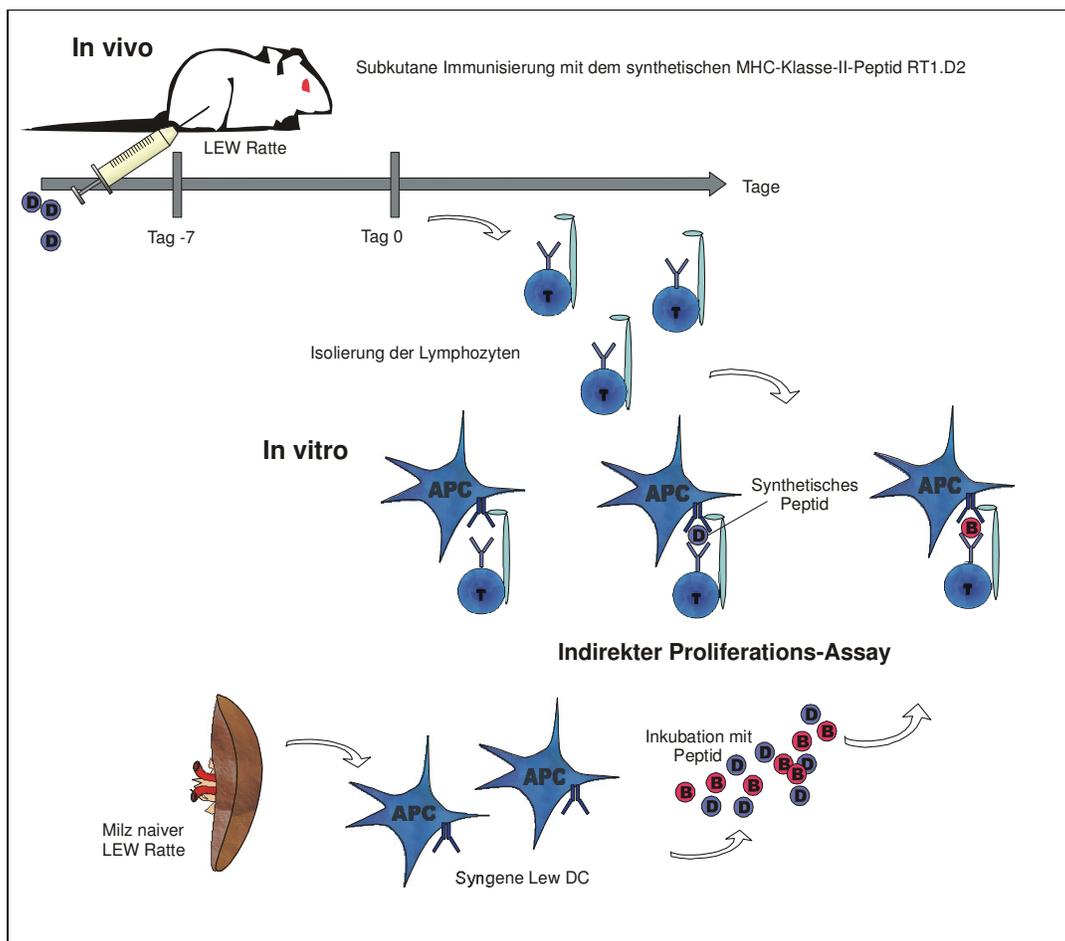


Abb. 4.1. Schematische Darstellung des indirekten Proliferations-Assays: Nachweis peptidspezifischer T-Lymphozyten durch die Bestimmung der Proliferationsrate, hier Peptid RT1.D2-spezifischer Zellen

Durch Immunisierung einer Ratte mit Allo-Peptid wurde der erste Antigenkontakt hergestellt. Die in vivo aktivierten T-Lymphozyten wurden durch erneuten Peptid-Antigenkontakt in vitro reaktiviert.

Durch Messung der Proliferationsrate wurde die Präsenz peptidspezifischer T-Lymphozyten nachgewiesen: Hohe Proliferation, die sich von der Hintergrundaktivität (Proliferation ohne Peptid) signifikant unterscheidet, bedeutet Anwesenheit und geringe Proliferation Abwesenheit spezifischer T-Lymphozyten. Um sicherzustellen, dass die Kultivierungsbedingungen in vitro eine Proliferation von T-Lymphozyten zulassen, wurde eine Proliferationskontrolle mit Con A (siehe Material und Methoden 3.5.1) durchgeführt. Bei optimalen Kultivierungsbedingungen lag diese Kontrolle zwischen 40.000 und 60.000 cpm – nur diese Versuche wurden in die Ergebnisse einbezogen. Jedes analysierte Peptid wurde in den Immunisierungsexperimenten in einem 6-fachen Ansatz an jeweils mindestens vier Tieren auf seine Immunität getestet.

4.1.1 Indirekter Proliferations-Assay

Abb. 4.1.1a zeigt die Proliferation von T-Lymphozyten nach Immunisierung einer naiven LEW-Ratte mit einem Gemisch der vier synthetischen WF-Peptiden RT1.B2, RT1.D2, RT1.B3 und RT1.D3.

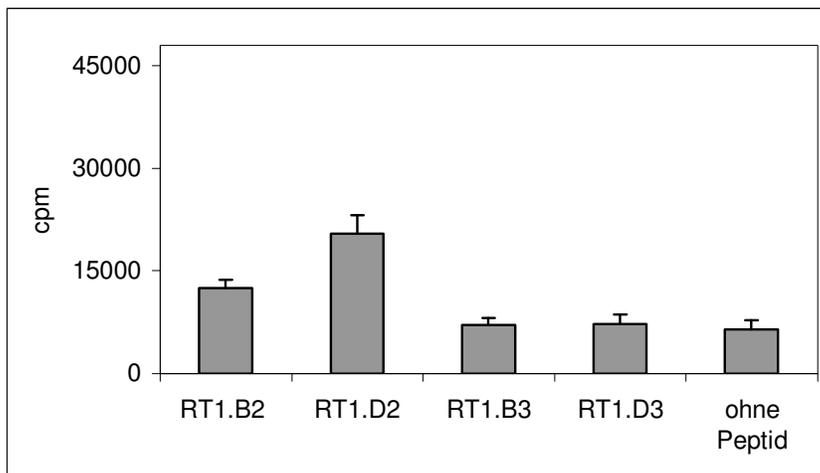


Abb. 4.1.1a Nachweis der Peptid-induzierten T-Zell-Proliferation im indirekten Proliferations-Assay nach Immunisierung mit einem Peptidgemisch aus RT1.B2, RT1.D2, RT1.B3, RT1.D3. Alle vier Peptide wurden in gleichen Konzentrationen appliziert (n=4)

Im Vergleich zu der Kontrolle ohne Peptid (6.479 ± 1.274 cpm) konnte bei den Peptiden RT1.B3 und RT1.D3 (7.056 ± 1110 cpm vs 7.281 ± 1.375 cpm) keine verstärkte Proliferation gemessen werden. Die Proliferation auf das Peptid RT1.D2 war signifikant höher als auf das Peptid RT1.B2 (20.499 ± 2627 cpm vs 12.537 ± 1.177 cpm; $p < 0,01$), welches jedoch immunogener als die Peptide RT1.D3 und RT1.B3 war. Somit ist Peptid RT1.D2 im Vergleich zu den anderen getesteten Peptiden das immundominante Peptid. Der Anspruch an das *in vitro*-Detektionssystem ist, dass während der dreitägigen Kultivierung *in vitro* ausschließlich die bereits *in vivo* aktivierten T-Lymphozyten reaktiviert werden und nicht naive T-Lymphozyten, die bisher keinen Antigenkontakt hatten.

Um dies nachzuweisen, wurde der Proliferations-Assay mit naiven T-Lymphozyten im Vergleich zu *in vivo* mit RT1.D2-aktivierten T-Lymphozyten durchgeführt. In beiden Fällen wurden die T-Lymphozyten mit RT1.D2-Peptid beladenen syngenen APCs inkubiert.

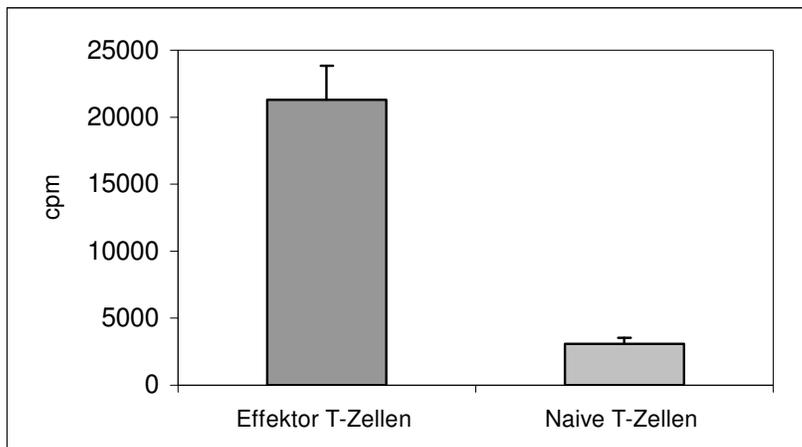


Abb. 4.1.1b Nachweis, dass ausschließlich *in vivo* mit Peptid RT1.D2 aktivierte Effektor-T-Lymphozyten im indirekten Proliferations-Assay in Gegenwart dieses Peptids nachzuweisen sind, nicht aber naive T-Lymphozyten

Nur *in vivo* bereits mit Peptid RT1.D2 aktivierte T-Lymphozyten sind im indirekten Proliferations-Assay durch Peptid RT1.D2 reaktivierbar (Abb. 4.1.1b) ($n=4$). Die Proliferation RT1.D2-spezifischer T-Lymphozyten ist gegenüber diesem Peptid hochsignifikant (Effektor-T-Zellen: 21.300 ± 2.551 cpm) gesteigert, während naive

Zellen nicht proliferieren (naive T-Zellen: 3.100 ± 420 cpm; $p < 0.001$). Zusätzlich wurde als weitere Kontrolle die Immunisierung mit TiterMax® alleine durchgeführt. Abbildung 4.1.1.c zeigt, dass die Immunisierung mit dem Adjuvanz allein keine peptid-spezifische T-Zellproliferation ermöglicht, daher proliferieren die Zellen in vitro mit Peptid in gleichem Ausmaß wie Zellen ohne Peptid ($n=4$). Ein vorheriger Antigenkontakt in vivo ist somit notwendig. Der indirekte Proliferations-Assay kann deshalb als in vitro-Detektionssystem für in vivo aktivierte T-Lymphozyten eingesetzt werden.

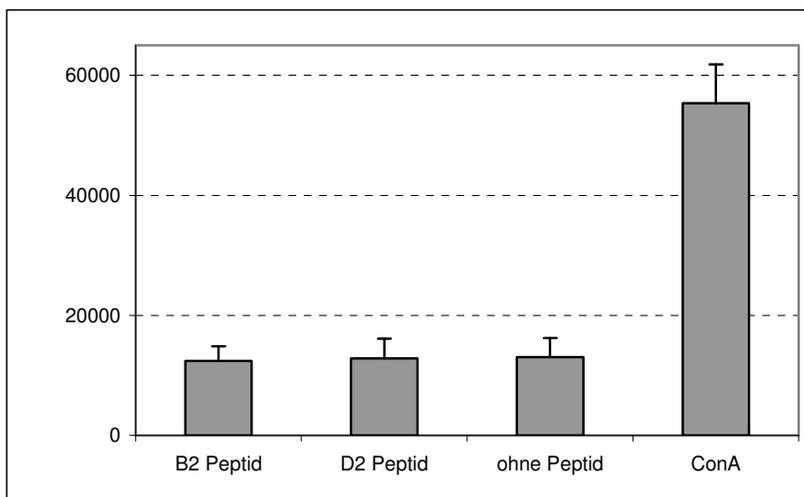


Abb. 4.1.1c Nachweis, dass Lymphozyten von in vivo mit TiterMax® immunisierten Tiere in vitro nicht gegenüber Peptid proliferieren.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob im indirekten Proliferations-Assay synthetische MHC-Klasse-II-Peptide nur über den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung T-Lymphozyten reaktivieren. Es stellte sich somit die Frage, ob antigenpräsentierende Zellen zur Reaktivierung sensibilisierter T-Lymphozyten im Assay notwendig sind, oder ob lösliche Peptide, d.h. nicht MHC-gebundene Peptide, T-Lymphozyten reaktivieren können. Daher wurden RT1.D2-spezifische T-Lymphozyten mit RT1.D2-beladenen dendritischen Zellen oder mit löslichem Peptid inkubiert. Ohne dendritische Zellen, d.h. mit löslichem Peptid, wurde keine Reaktivierung zuvor aktivierter T-Lymphozyten erreicht (4.200 ± 568 cpm) (Abb. 4.1.1d); es besteht ein hochsignifikanter

Unterschied zu der Proliferation von T-Lymphozyten im Ansatz mit dendritischen Zellen, d.h. MHC-gebundenem Peptid (21.430 ± 2.034 cpm; $p < 0,001$; $n=4$).

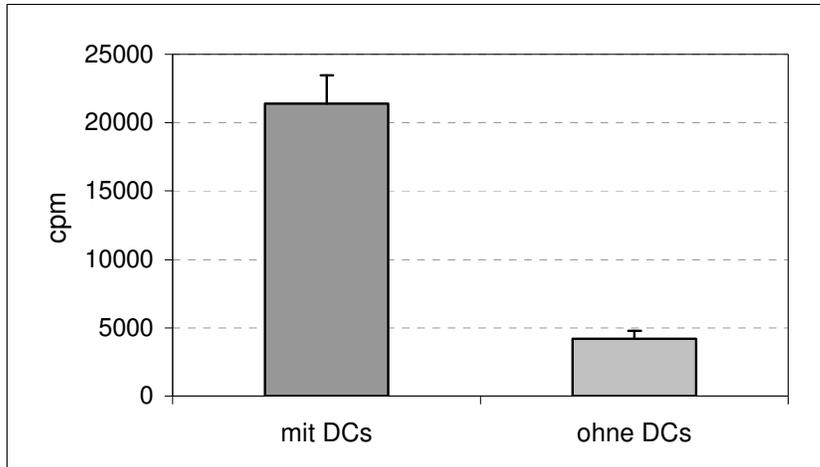


Abb. 4.1.1d Bedeutung Peptid-beladener dendritischer Zellen (DCs) für die Reaktivierung RT1.D2-aktivierter spezifischer T-Lymphozyten im indirekten Proliferations-Assay

Die Präsentation des synthetischen MHC-Klasse-II-Peptids durch antigenpräsentierende Zellen ist somit eine Voraussetzung für die Reaktivierung sensibilisierter T-Lymphozyten *in vitro*.

Im Folgenden gilt es die Frage zu beantworten, ob durch Immunisierung mit WF-Zellen, d.h. mit dem gesamten MHC-Klasse-II Molekül, T-Lymphozyten aktiviert werden, die *in vitro* durch synthetisches MHC-Klasse-II-Peptid (RT1.D2 oder RT1.B2) restimulierbar und somit nachweisbar sind. Dies würde nämlich bedeuten, dass die Prozessierung der MHC-Klasse-II-Moleküle *in vivo* durch antigenpräsentierende Zellen u.a. zu solchen Peptiden führt, die die gleichen Subtypen von T-Lymphozyten aktivieren wie auch die synthetischen Peptide.

Daher wurde eine naive LEW-Ratte mit WF-Milzzellen subkutan sensibilisiert. Die aktivierten T-Lymphozyten wurden dann im indirekten Proliferations-Assay auf ihre Proliferation gegenüber Peptid-beladenen dendritischen Zellen getestet (Abb.4.1.1.d, $n=5$).

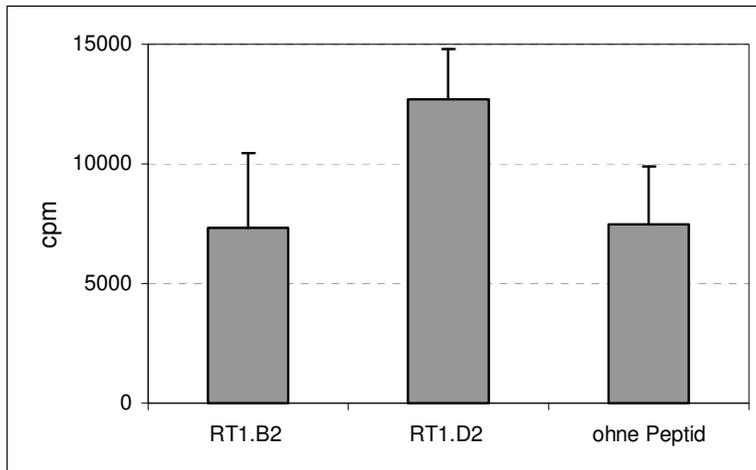


Abb. 4.1.1e Nachweis der Restimulierbarkeit von Effektor-T-Lymphozyten mit Peptiden RT1.D2 oder RT1.B2 nach Immunisierung mit WF-Zellen

Im Proliferations-Assay (Abb. 4.1.1.e) konnten die *in vivo* sensibilisierten T-Lymphozyten nur durch das Peptid RT1.D2 signifikant restimuliert werden (RT1.D2: 12.690 ± 2.118 cpm). Die Proliferation auf RT1.D2 war signifikant höher als auf Peptid RT1.B2 (RT1.D2: 12.690 ± 2.118 cpm vs RT1.B2: 7.324 ± 3.127 cpm; $p < 0,05$), die sich wiederum nicht signifikant von der Kontrolle ohne Peptid unterschied (Kontrolle: 7.465 ± 2.440 cpm) ($n=4$).

Somit gilt für MHC-Klasse-II-Moleküle, die *in vivo* prozessiert werden, dass sie T-Lymphozyten aktiveren, die *in vitro* das synthetische Peptid RT1.D2 erkennen. Hierbei zeigt sich wieder die Immundominanz von RT1.D2, da keine RT1.B2-spezifischen T-Lymphozyten im Detektionssystem nachweisbar waren.

4.1.2 Direkter Proliferations-Assay

Bisher wurde die Bedeutung der synthetischen Peptide für den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung untersucht. Um zu klären, welchen Einfluss die Peptide auf den direkten Weg der Allo-Antigenerkennung haben, wurde nachfolgendes Experiment durchgeführt. Im sogenannten direkten Proliferations-Assay wurden naive LEW T-Lymphozyten mit dendritischen Zellen der WF-Ratte inkubiert. Da innerhalb der T-Lymphozytenpopulation der Anteil allo-reaktiver T-Lymphozyten, die fremde MHC-

Moleküle auf dem direkten Weg der Allo-Antigenerkennung erkennen, mit bis zu 10% sehr hoch ist, benötigen diese Zellen keinen Erstkontakt in vivo.

Verglichen wird die Proliferation der naiven LEW T-Lymphozyten gegenüber unbeladenen oder Peptid-beladenen dendritischen WF-Zellen (Abb.4.1.2).

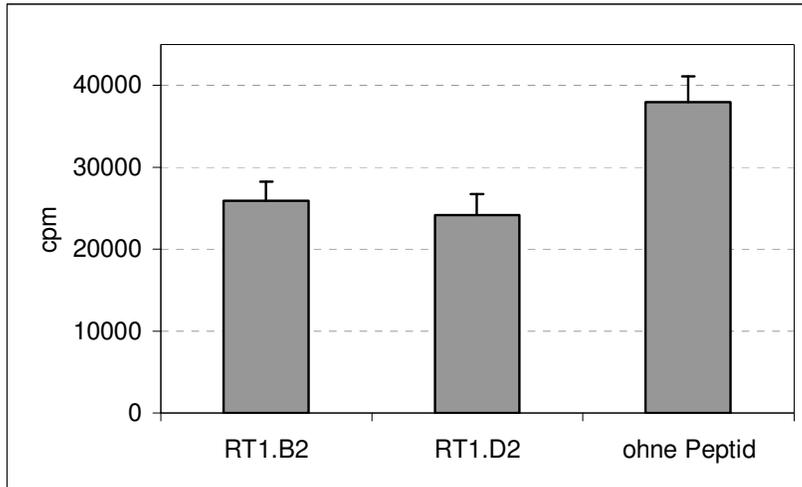


Abb. 4.1.2 Beeinflussung der Allo-Antwort naiver T-Lymphozyten durch synthetisches MHC-Klasse-II-Peptid im direkten Proliferations-Assay

Die Peptide inhibieren den direkten Weg der Allo-Antigenerkennung signifikant (RT1.B2: 25.690 ± 2.321 cpm, RT1.D2: 22.173 ± 2.543 cpm vs ohne Peptid: 37.965 ± 3.194 cpm; $p < 0,05$; $n=4$), wie durch die dort vergleichsweise geringere Proliferation verdeutlicht wird; beide Peptide inhibieren den direkten Weg der Allo-Antigenerkennung.

4.1.3 Durchflusszytometrische Analyse

Zur weiteren Charakterisierung des in vitro-Testsystems wurden durchflusszytometrische Untersuchungen der Lymphknoten eines naiven und eines immunisierten Tieres durchgeführt. Im naiven Lymphknoten lassen sich fast ausschließlich Lymphozyten finden, die sich in folgende Subpopulationen unterteilen: 46,8 % $CD4^+$ -Zellen, 19,2 % $CD8^+$ -Zellen und 33,4 % B-Zellen ($n=4$).

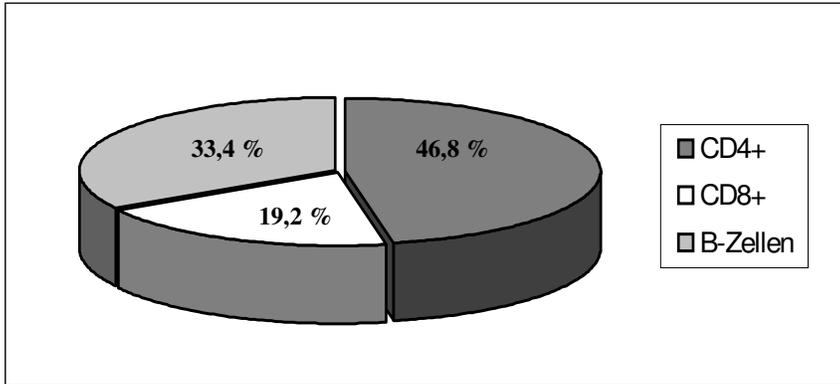


Abb. 4.1.3a Verteilung der Zellpopulationen in einem naiven Lymphknoten:
46,8 % CD4⁺-Zellen, 19,2 % CD8⁺-Zellen und 33,4 % B-Zellen

In einem naiven Tier liegt der Anteil aktivierter T-Lymphozyten unter 0,5 %. Nach Immunisierung mit Peptid RT1.D2 war im Vergleich zu einem naiven Lymphknoten eine hochsignifikante Zunahme der IL-2-Rezeptor-Expression auf CD4⁺-Zellen zu beobachten: 8,3 % der CD4⁺-Zellen sind IL-2-Rezeptor-positiv und somit aktiviert (Abb.4.1.3b, n=4). Eine unspezifische Reaktion auf das Adjuvans wurde durch die Versuche mit TiterMax® im Proliferationsassay (siehe Abb. 4.1.1c) ausgeschlossen.

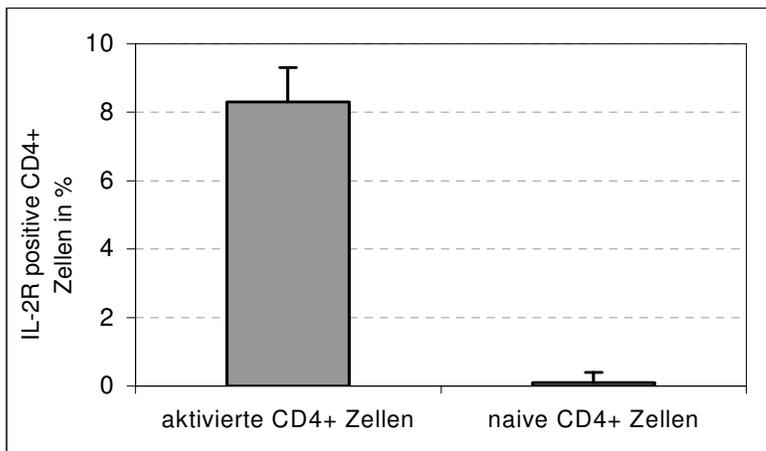


Abb. 4.1.3b Durchflusszytometrische Untersuchung zur IL-2-Rezeptor-Expression im Lymphknoten: IL-2-Rezeptor positive CD4⁺-Zellen nach Immunisierung mit RT1.D2 im Vergleich zu naiven CD4⁺-Zellen

Um die Sensitivität des indirekten Proliferations-Assay zu beurteilen, wurden in einem weiteren Experiment selektiv T-Lymphozyten untersucht, die mit magnetischer Zellsortierung (> 95 %) aufgereinigt wurden (Abb. 4.1.3c).

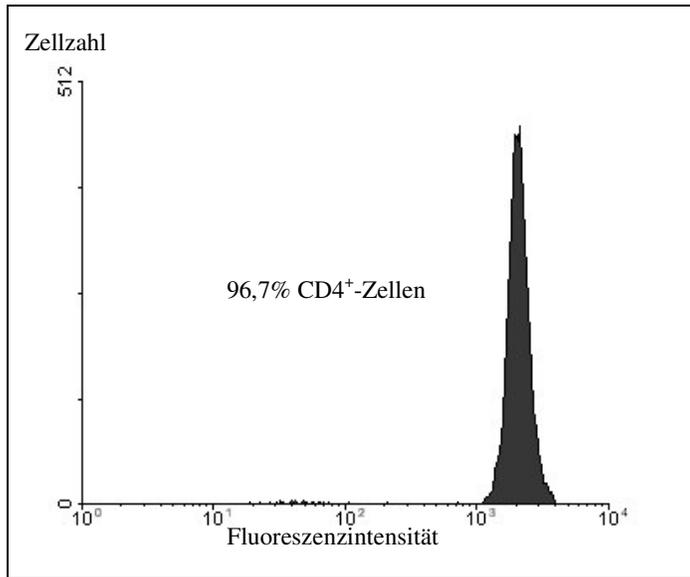


Abb. 4.1.3c Durchflusszytometrisch gemessene Reinheit der CD4⁺-T-Lymphozyten nach Isolierung durch magnetische Zellsolierung

Im Vergleich zum indirekten Proliferations-Assay mit einem Lymphozytengemisch wurde durch die magnetische Zellsolierung CD4⁺-T-Lymphozyten im Proliferations-Assay kein anderes Ergebnis gefunden - beide Ansätze detektieren aktivierte T-Lymphozyten. Im Folgenden werden deshalb nur die Zellen des Lymphozytengemischs im indirekten Proliferations-Assay analysiert.

Zusammenfassend gilt, dass nicht alle hier getesteten synthetischen MHC-Klasse-II-Peptide immunogen sind; Peptid RT1.D2 ist immundominant d.h. es induziert die stärkste T-Zellproliferation. Das in vitro-Detektionssystem, der indirekte Proliferations-assay, erlaubt die Detektion in vivo aktivierter T-Lymphozyten, die sowohl durch Immunisierung mit synthetischen MHC-Klasse-II-Peptiden als auch mit dem kompletten MHC-Klasse-II-Molekül (Immunisierung mit WF-Zellen) aktiviert wurden.

Dabei basiert das Detektionssystem auf der Fähigkeit aktivierter T-Lymphozyten, nach einem erneuten Antigenkontakt zu proliferieren. Dies ist eine essentielle Voraussetzung für die Analyse der allo-reaktiven Situation auf T-Zell-Ebene nach Organtransplantation.

4.2 Charakterisierung peptidinduzierter Effekte nach Transplantation

Die Versuche wurden für zwei verschiedene Organmodelle durchgeführt, für das Dünndarm- und das Nierentransplantat. Mit dem Dünndarm wurde ein sehr immunogenes, mit der Niere ein weniger immunogenes Organ untersucht.

Tab. 4.2a: Gruppeneinteilung der dünn darmtransplantierten Tiere: Dargestellt sind das Behandlungsschema und die Überlebensdaten . Tag -7 = 7 Tage prae OP; Tage 20 und 27 = Tage 20 und 27 post OP; - = ohne und + = mit Immunsuppression (CsA 20mg/kg/KG von Tag 0-13 post OP)

| Gruppen | Peptid (Applikationstag) | CsA (20mg/kg/KG) | Transplantatüberleben (Tage) | Mittelwert | Stabw |
|---------|-----------------------------|---------------------|---------------------------------|------------|-------|
| I | RT1.D2 (-7, 0) | - | 3, 3, 3, 4, 4 | 3,4 | 0,5 |
| II | RT1.B2 (-7, 0) | - | 3, 4, 4, 5 | 4,0 | 0,8 |
| III | RT1.D2 (20, 27) | + | 29 , 29, 34, 34, 37, 39 | 33,7 | 4,1 |
| IV | RT1.B2 (20, 27) | + | 33, 35, 36, 42, 72, 350 | 69,7 | 65,5 |
| V | - | + | 69, 4 x 350 | 173,8 | 58,6 |
| VI | - | - | 5, 5, 5, 5, 6, 6 | 5,3 | 0,5 |

Wie der Vergleich der Überlebensdaten aus beiden Organmodellen widerspiegelt, wird das Dünndarmtransplantat schneller abgestoßen als das Nierentransplantat (Tab. 4.2a und 4.2b). Diese Beobachtung lässt sich durch die höhere Immunogenität des Dünndarms erklären.

Tab. 4.2b Gruppeneinteilung der nierentransplantierten Tiere: Dargestellt sind das Behandlungsschema und die Überlebensdaten. Tag -7 = 7 Tage prae OP; Tage 20 und 27 = Tage 20 und 27 post OP; - = ohne und + = mit Immunsuppression (CsA 5mg/kg/KG von Tag 0-4 post OP)

| Gruppen | Peptid (Applikationstag) | CsA (5mg/kg/KG) | Transplantatüberleben (Tage) | Mittelwert | Stabw |
|---------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------|------------|-------|
| I | RT1.D2 (-7, 0) | - | 3, 4, 4, 4, 5 | 4,0 | 0,7 |
| II | RT1.B2 (-7, 0) | - | 5, 5, 5, 6, 7 | 5,6 | 0,9 |
| III | RT1.D2 (20, 27) | + | 23, 28, 35, 41, 58 | 37,0 | 13,6 |
| IV | RT1.B2 (20, 27) | + | 36, 47, 52, 63 | 49,5 | 11,2 |
| V | - | + | 33, 47, 54, 55, 55, 62 | 51,0 | 10,0 |
| VI | - | - | 5, 7, 7, 8, 8, 10 | 7,5 | 1,6 |

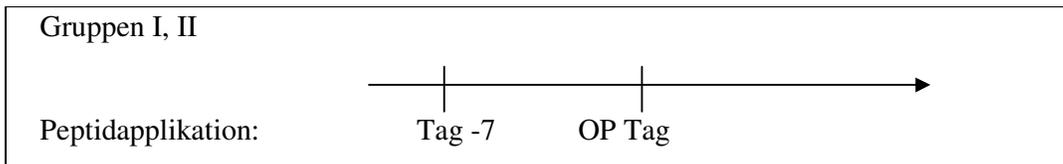
Im Nachfolgenden werden beide Organmodelle gegenübergestellt, um organunabhängige Gemeinsamkeiten zu identifizieren.

4.2.1 Überlebensdaten

4.2.1.1 Überlebensdaten nach präoperativer Immunisierung

In den Versuchsmodellen I und II wurden die Empfängertiere sieben Tage vor der Operation und am Operationstag mit Peptid RT1.D2 (Gp I) oder RT1.B2 (Gp II) sensibilisiert, Kontrolltiere (Gp VI) erhielten kein Peptid (Abb. 4.2.1.1a). Durch den Verzicht auf Immunsuppression nach der Organtransplantation wurde der alleinige Effekt des Peptids untersucht.

Abb. 4.2.1.1a Gruppen nach präoperativer Peptid-Sensibilisierung, keine Immunsuppression



Die Immunisierung mit den beiden MHC-Klasse-II-Peptiden RT1.D2 (Gp I) oder RT1.B2 (Gp II) vor Dünndarm- oder Nierentransplantation beschleunigte in beiden Modellen die Transplantatabstoßung, wobei die Sensibilisierung mit dem dominanten Peptid RT1.D2 eine schnellere Transplantatabstoßung induzierte.

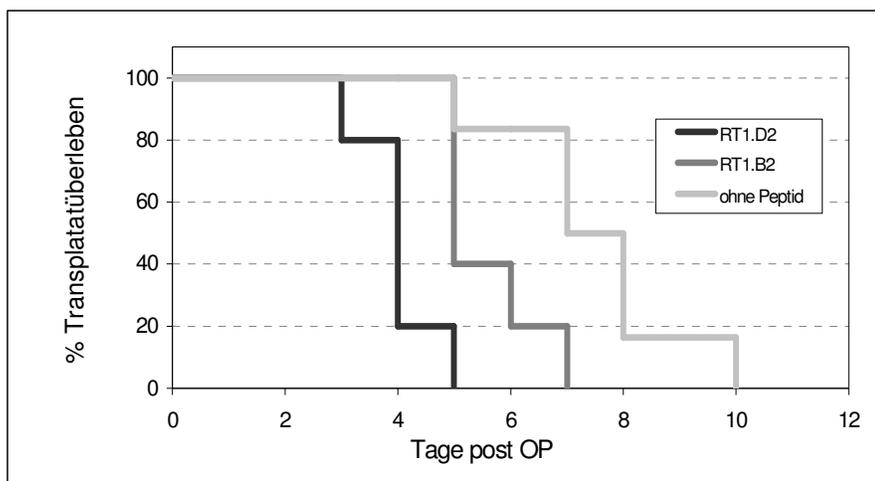


Abb. 4.2.1.1b Beschleunigung der akuten Abstoßung von Nierentransplantaten durch präoperative Immunisierung mit Peptid RT1.D2 oder RT1.B2

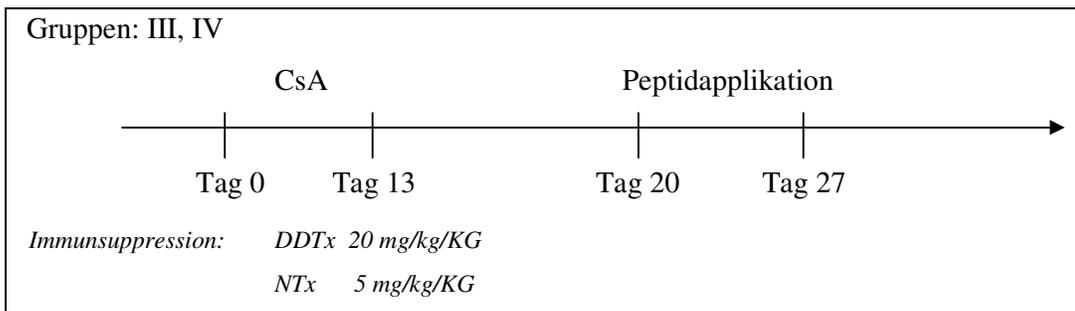
Das obige Kaplan-Meier-Diagramm (Abb. 4.2.1.1b) stellt die zeitliche Folge der Abstoßungszeitpunkte nach Nierentransplantation für die Gruppe I mit RT1.D2- oder Gruppe II mit RT1.B2-sensibilisierten Tieren sowie die Kontrolle ohne Immunisierung (Gp VI) dar (Abb. 4.2.1.1b). Wie in Tabelle 4.2b aufgeführt, verursacht die Immunisierung mit dem immundominanten Peptid RT1.D2 (Gp I) eine signifikant beschleunigte Abstoßung des Nierentransplantats im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gp VI) (Gp I: $4,0 \pm 0,7$ Tage vs Gp VI: $7,5 \pm 1,6$ Tage; $p < 0,05$).

Ein vergleichbares Ergebnis wurde nach Dünndarmtransplantation beobachtet: Lag der Abstoßungszeitpunkt ohne Immunsuppression bei durchschnittlich fünf Tagen ($5,3 \pm 0,6$ Tage), so wurde durch Sensibilisierung mit RT1.B2 (Gp II) das Transplantatüberleben auf vier Tage ($4,0 \pm 0,8$ Tage), durch RT1.D2 (Gp I) auf drei Tage ($3,4 \pm 0,5$ Tage) verkürzt. Somit beschleunigte die Immunisierung mit dem immundominanten Peptid RT1.D2, unabhängig vom transplantierten Organ, die Transplantatabstoßung.

4.2.1.2 Überlebensdaten nach postoperativer Immunisierung

Im Gegensatz zu Tieren der Gruppen I und II wurden die Tiere der Gruppen III und IV nach der Transplantation mit Cyclosporin A behandelt. Die Peptidapplikation erfolgte nicht prä- sondern postoperativ, um zunächst die Abstoßung durch die Immunsuppression zu kontrollieren.

Abb. 4.2.1.2a: Gruppen mit Immunsuppression und postoperativer Peptid-Sensibilisierung



Die dünndarmtransplantierten Tiere der Gruppen III und IV erhielten 14 Tage ab Transplantation Cyclosporin A in einer Dosierung von 20 mg/kg/KG. Desweiteren

wurde den Tieren an den Tagen 20 und 27 je eines der Peptide RT1.D2 (Gp III) oder RT1.B2 (Gp IV) appliziert, die Kontrolltiere erhielten kein Peptid (Gp V).

Nach Dünndarmtransplantation (Tab. 4.2a) stießen in der Gruppe IV, hier wurden die Tiere mit RT1.B2 behandelt, 83 % der Tiere das Transplantat ab (69,7±65,5 Tage). Eine noch größere, signifikante Beschleunigung der Transplantatabstoßung im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle (Gp V) wurde durch Sensibilisierung mit dem Peptid RT1.D2 (Gp III) erreicht (Gp III vs. Gp V; $p < 0,05$). Von den sieben Tieren dieser Behandlungsgruppe stießen alle das Transplantat ab (33,7± 4,1 Tage). Kontrolltiere (Gp V), die nicht an den Tagen 20 und 27 behandelt wurden, überlebten mit diesem immunsuppressiven Protokoll langfristig. Das nachfolgende Diagramm zeigt den zeitlichen Verlauf der Abstoßungszeitpunkte aller drei Gruppen.

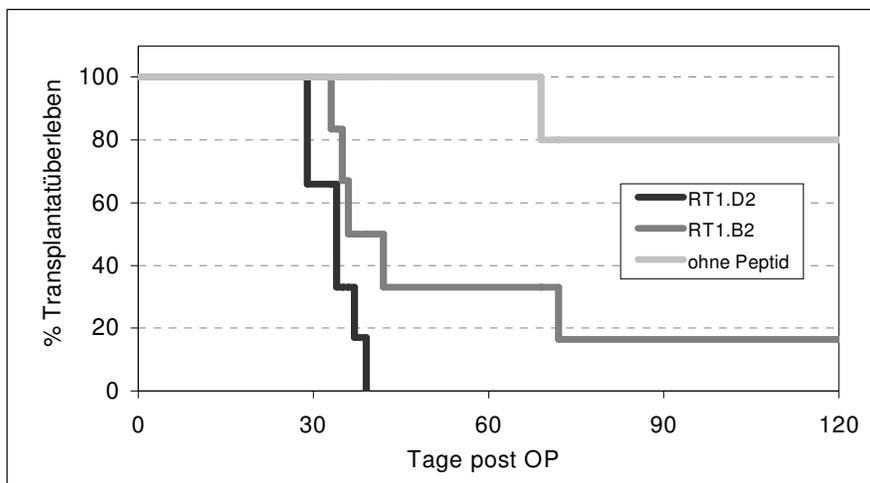


Abb. 4.2.1.2b Beschleunigung der akuten Abstoßung von Dünndarmtransplantaten durch postoperative Immunisierung mit Peptid RT1.D2 oder RT1.B2

Auch nach Nierentransplantation wurden die Empfängertiere postoperativ an den Tagen 20 und 27 entweder mit Peptid RT1.B2 oder RT1.D2 sensibilisiert. Die Dosierung der Immunsuppression mit Cyclosporin A wurde mit 5 mg/kg/KG (von Tag 0 bis 5) der geringeren Immunogenität des transplantierten Organs angepasst. In Abbildung 4.2.1.2.c wird die Transplantatabstoßung für die einzelnen Gruppen dargestellt.

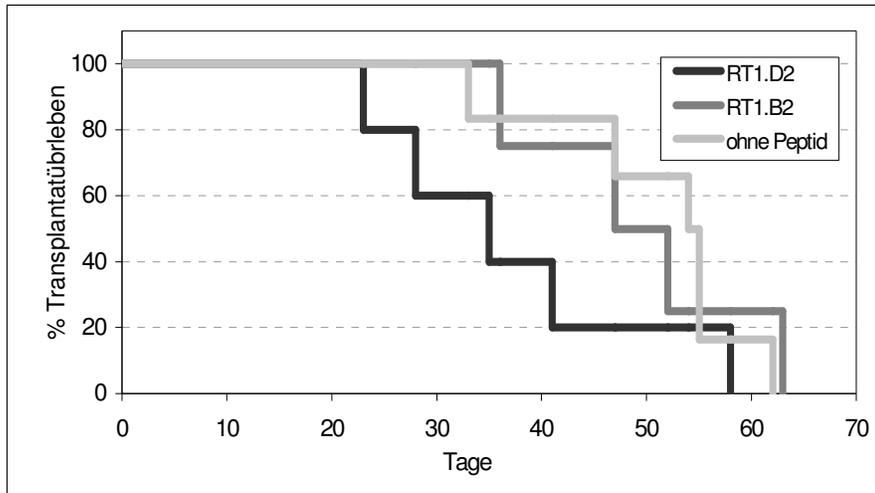


Abb. 4.2.1.2c Beschleunigung der akuten Abstoßung von Nierentransplantaten durch postoperative Immunisierung mit Peptid RT1.D2 oder RT1.B2

Nach Nierentransplantation (Tab. 4.2b) wurde durch Sensibilisierung mit RT1.B2 (Gp IV) die Transplantatabstoßung nicht signifikant beschleunigt ($49,5 \pm 11,2$ Tage) im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptid ($51,0 \pm 10,0$ Tage) (Gp V). Hingegen ist eine Verkürzung des Transplantatüberlebens nach Immunisierung mit Peptid RT1.D2 ($37,0 \pm 13,6$ Tage) (Gp III) zu beobachten. Auch nach Nierentransplantation zeigt somit das immundominante Peptid RT1.D2 einen stärkeren Effekt auf die Transplantatabstoßung (Abb.4.2.1.2c).

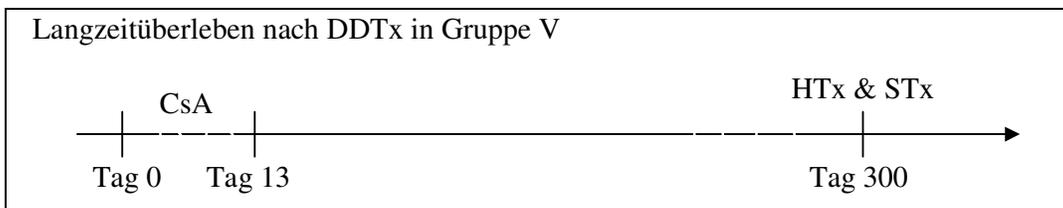
4.2.2 In vivo- und in vitro-Tests zum Langzeitüberleben nach Dünndarmtransplantation

In der Kontrollgruppe (Gp V) wurde Langzeitüberleben nach Dünndarmtransplantation mit Cyclosporin A erzielt; 80% überlebten länger als 100 Tage. 350 Tage nach Transplantation wurden mit den Tieren, die keine klinischen oder morphologischen Zeichen der Abstoßung zeigten, Toleranztests durchgeführt.

4.2.2.1 In vivo-Tests zum Langzeitüberleben

Der Toleranznachweis beruhte darauf, dass die transplantierten Tiere erneut mit Spenderantigen konfrontiert wurden.

Abb. 4.2.2.1a Toleranznachweis durch zusätzliche Transplantation von einem Spenderherz (HTx) oder Spenderhaut (STx) nach Erreichen einer stabilen Transplantatfunktion (> 350 Tage) nach Dünndarmtransplantation



Hierzu erhalten die Tiere entweder Herz- oder Hauttransplantate vom WF-Spender oder einem BN-Drittstamm (je 2 Tiere erhielten Herz- bzw. Hauttransplantat). Während im Toleranzstadium keine Immunantwort gegen WF-Antigene (d.h. keine Abstoßung von sowohl Herz- als auch Hauttransplantaten) vorliegen darf, ist gegen BN-Antigene eine Immunantwort zu erwarten (d.h. die Transplantate werden akut abgestoßen). Sowohl WF-Herz- als auch die WF-Hauttransplantate wurden toleriert. Dagegen wurden sowohl allogene BN-Spenderherzen als auch die BN-Spenderhauttransplantate in weniger als 10 Tagen abgestoßen.

Als Nächstes wurde untersucht, ob die nachgewiesene Toleranz mit einer Nicht-Reaktivität gegenüber dem immundominanten RT1.D2 Peptid korreliert. Dies kann im DTH-Assay (siehe Material und Methoden 3.2.3) durch Ausbleiben einer Ohrschwellung nach Peptidapplikation nachgewiesen werden.

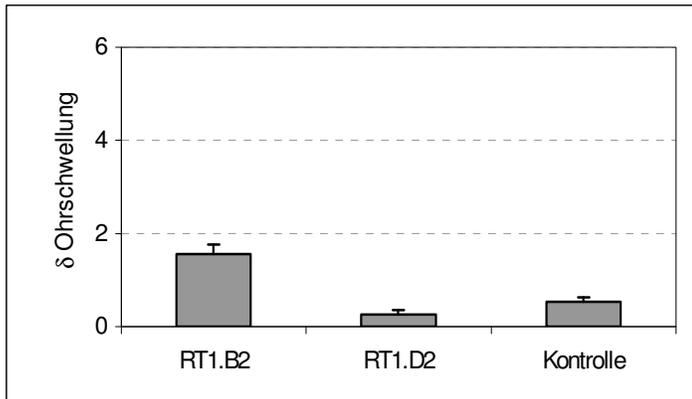


Abb. 4.2.2.1b DTH-Test bei Langzeittieren nach auf Peptid RT1.D2, RT1.B2 oder einer NaCl-Kontrolle

Der DTH-Test zeigte, dass im langzeitüberlebenden Tier keine Reaktivität gegenüber dem immunogenen Peptid RT1.D2 nachzuweisen war (n=4). Dieser Test zeigte, dass die toleranten Tiere der Gruppe V eine verminderte DTH-Reaktion gegenüber dem immundominanten Peptid RT1.D2 im Vergleich zum Kontrollpeptid RT1.B2 aufwiesen.

4.2.2.2 In vitro-Tests zum Langzeitüberleben

Die im DTH-Assay nachgewiesene Nichtreaktivität der T-Lymphozyten gegenüber dem RT1.D2-Peptid wurde ebenfalls im indirekten Proliferationsassay überprüft (Abb. 4.2.2.2.)

Das Ergebnis des Proliferations-Assay zeigt, dass die T-Lymphozyten der Langzeittiere im Vergleich zu den Kontrollen nicht mehr auf die synthetischen Peptide reagieren (RT1.D2: 2.536 ± 324 cpm, RT1.D3: 2.377 ± 189 cpm, RT1.B2: 1.597 ± 468 cpm, RT1.B3: 3.707 ± 722 cpm, ohne Peptid: 2.029 ± 375 cpm). Die Con A-Kontrolle zeigt die Stimulierbarkeit der T-Lymphozyten. Dies bedeutet, dass auch mit diesem Assay keine T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten, die spezifisch für das immundominante Peptid RT1.D2 sind. Dies wird als weiteres Indiz gedeutet, dass die nach Dünndarmtransplantation induzierte Toleranz mit einer fehlenden Reaktivität auf das immundominante Peptid RT1.D2 korreliert.

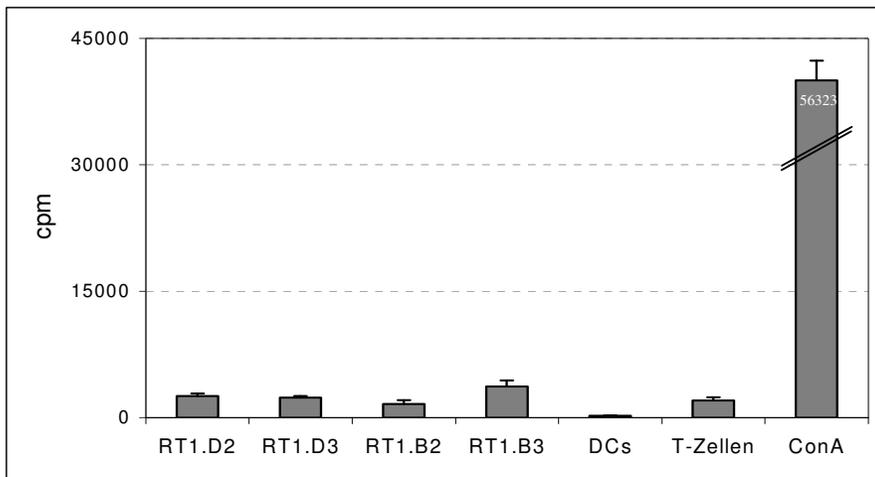


Abb. 4.2.2.2 Proliferations-Assay langzeitoleranter Tiere nach Dünndarmtransplantation; die ConA-Kontrolle zeigt die Stimulierbarkeit der T-Lymphozyten (n=4).

4.2.2.3 Zytokinexpression im Dünndarmtransplantat toleranter Tiere

Da in dem Versuchsmodell nach Dünndarmtransplantation Toleranz durch Immunsuppression erreicht wurde, stellte sich die Frage, wie das Zytokinmuster im Transplantat aussieht. Hierbei wurden Zytokine der T-Zell-, und Makrophagen-Aktivierung sowie typische inflammatorische Zytokine untersucht (Abb. 4.2.2.3). Hierzu wurde die Zytokinexpression im Dünndarm toleranter Tiere mit der syngener und naiver Kontrollen verglichen. Aufgrund der Komplexizität der Versuche wurde der RNase-Protektions Assay nur an jeweils zwei Versuchstieren der einzelnen Gruppen durchgeführt. Im Jejunum des Transplantats konnte sowohl bei syngenen Kontrolltieren als auch bei langzeitüberlebenden Tieren eine erhöhte Genexpression von TNF- β detektiert werden; dieser Sachverhalt deutet auf eine schwache T- und B-Zellaktivierung hin, die in der naiven Kontrolle, also bei einem nicht transplantierten Tier, nicht gefunden wurde.

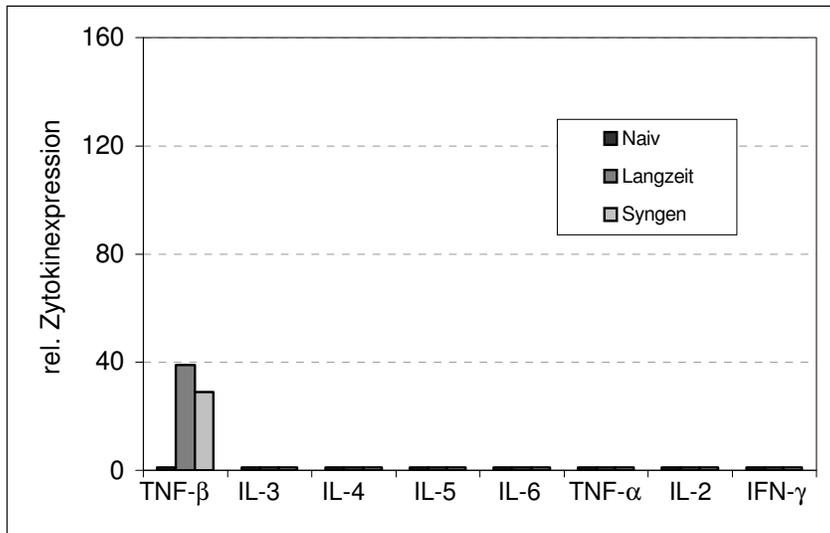


Abb. 4.2.2.3 Beispielhafte Darstellung der Zytokinexpression nach Dünndarmtransplantation im Jejunum eines nicht operierten, naiven Tieres und eines syngenens sowie eines toleranten Tieres (je n=2 Tiere pro Gruppe durchgeführt).

Vergleicht man die syngene Kontrolle mit dem toleranten Tier, so wird deutlich, dass im toleranten Organ keine gesteigerte Zytokinexpression messbar war.

Daneben wurde beobachtet, dass die Zytokinexpression im Ileum gegenüber der im Jejunum desselben Tieres immer erhöht war – eine Beobachtung, die auch bei akut abstoßenden Tieren gemacht werden konnte (siehe unten) und sich dadurch erklären ließe, dass im Ileum vergleichsweise mehr lymphatisches Gewebe vorliegt.

4.2.2.4 H.E.-Histologie zum Toleranzstadium nach Dünndarmtransplantation

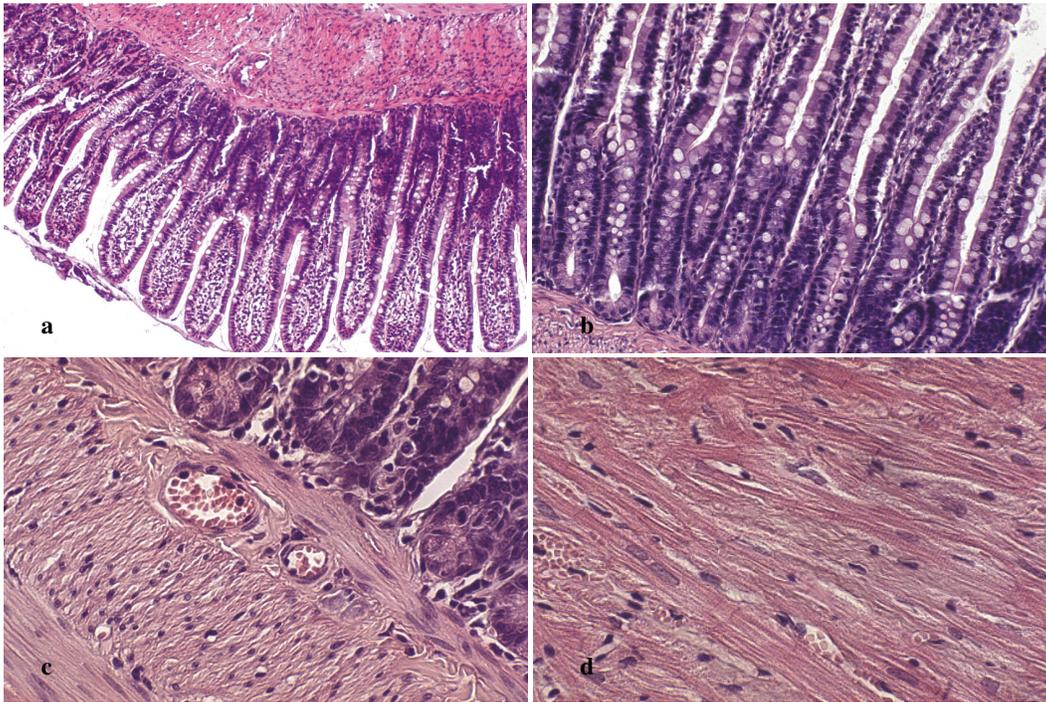


Abb. 4.2.2.4 H.E.-Histologie zum Toleranzstadium; a: syngene Kontrolle nach Dünndarmtransplantation (40x), b: Toleranzstadium nach Dünndarmtransplantation (Zotten) (200x) und c: Toleranzstadium nach Dünndarmtransplantation (Mukosa) (400x) und d: WF-Indikatorherz nach 60 Tagen im toleranten Tier nach Dünndarmtransplantation (400x)

In Abb. 4.2.2.4 wird die H.E.-Histologie eines toleranten Tieres nach Dünndarmtransplantation (Gp V) mit einer syngenen Kontrolle nach Dünndarmtransplantation verglichen. Die Zotten beider Transplantate sind normal, mit reichlich funktionsfähigen Becherzellen und geringem zellulären Infiltrat (Abb. 4.2.2.4a, b). Die Gefäße in der Submukosa des toleranten Transplantats zeigen keine Zeichen der Abstoßung (Abb. 4.2.2.4c). Im WF-Indikatorherz (Überleben > 60 Tage) lässt sich kein zelluläres Infiltrat nachweisen; histologisch gibt es keine Zeichen der Abstoßung. Das Toleranzstadium der Langzeittiere nach Dünndarmtransplantation wird somit auch histologisch bestätigt.

4.2.3 T-Zell-Reaktivität nach Peptidapplikation

Die nach Dünndarmtransplantation induzierte Toleranz (Kapitel 4.2.2) scheint auf der fehlenden Präsenz RT1.D2-reaktiver T-Lymphozyten zu basieren. In diesem Kapitel wird nun untersucht, ob die durch Immunisierung mit Peptid RT1.D2 oder RT1.B2 induzierten T-Lymphozyten die Transplantatfunktion beeinflussen.

4.2.3.1 T-Zell-Reaktivität nach Dünndarmtransplantation

Zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung wurden die Milz-T-Lymphozyten dieser Tiere auf ihre Reaktivität gegenüber den synthetischen Peptiden RT1.B2 und RT1.D2 *in vitro* hin untersucht. Zunächst wurde die Reaktivität der T-Lymphozyten der Tiere untersucht, die an den Tagen 20 und 27 mit Peptid RT1.B2 (Gp IV) immunisiert wurden (vgl. die folgende Darstellung Abb. 4.2.3.1a).

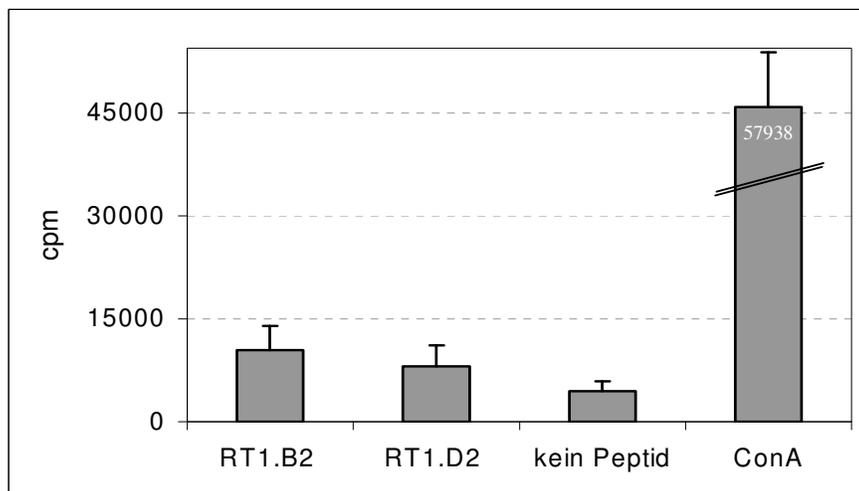


Abb. 4.2.3.1a T-Zell-Reaktivität nach postoperativer Immunisierung mit Peptid RT1.B2 nach Dünndarmtransplantation (n=3)

Die an den Tagen 20 und 27 mit RT1.B2-Peptid behandelten Tiere zeigten im Proliferations-Assay keine signifikant erhöhte Proliferation gegenüber dem Peptid RT1.B2 im Vergleich zum Peptid RT1.D2 (RT1.B2: 10.487 ± 3.445 cpm vs RT1.D2: 8.066 ± 3.064 cpm). Die Reaktivierung durch das Peptid RT1.B2 lässt sich auf den Immunisierungseffekt mit diesem Peptid erklären, die Antwort gegenüber Peptid RT1.D2 als Reaktion auf eine Sensibilisierung durch das sehr immunogene WF-Dünndarmtransplantat.

Anders verhält es sich auch bei postoperativer Applikation von Peptid RT1.D2 (Gp III): Nach Immunisierung mit dem Peptid RT1.D2 wurde eine deutlich höhere Reaktivierung von T-Lymphozyten gegenüber diesem Peptid nachgewiesen; die Proliferation auf das Peptid RT1.D2 unterscheidet sich signifikant von der gegen das Peptid RT1.B2 (17.658 ± 1.662 cpm vs 7.674 ± 2.200 cpm; $p < 0,05$) (Abb. 4.2.3.1b).

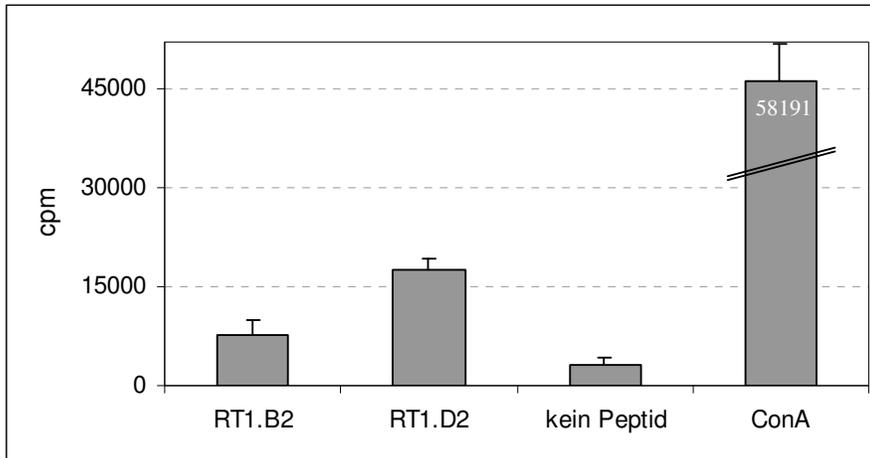


Abb. 4.2.3.1b T-Zell-Reaktivität nach postoperativer Immunisierung mit Peptid RT1.D2 nach Dünndarmtransplantation (n=3)

Auch in diesem Experiment zeigt sich die starke Immunogenität des Peptids RT1.D2, die nicht nur diese in vitro-Ergebnisse, sondern auch die Überlebensdaten widerspiegeln: Mit RT1.D2 immunisierte Tiere stoßen ihr Transplantat schneller ab als mit Peptid RT1.B2 immunisierte Tiere (Gp III und IV, Abb.4.2). Die deutlich verkürzte Transplantatfunktion geht mit der Präsenz RT1.D2-spezifischer T-Lymphozyten einher. Im Weiteren soll geklärt werden, ob es sich hierbei um organübergreifende Effekte handelt.

4.2.3.2 T-Zell-Reaktivität nach Nierentransplantation

Auch nach Nierentransplantation und Sensibilisierung mit dem Peptid RT1.B2 an den Tagen 20 und 27 wurden zum Zeitpunkt der Abstoßung Milz und zervikale Lymphknoten auf deren T-Zell-Reaktivität hin untersucht. Es lassen sich weder in Milz noch in zervikalen Lymphknoten spezifische T-Lymphozyten gegen das Peptid RT1.B2 nachweisen (z.B. Milz: RT1.B2: 2.084 ± 415 cpm, RT1.D2: 2.001 ± 267 cpm, ohne Peptid: 661 ± 231 cpm). Die Reaktivität dieser isolierten T-Lymphozyten gegen dendritische WF-Zellen (15.094 ± 1.326 cpm) im direkten Proliferations-Assay beweist jedoch, dass allo-reaktive T-Lymphozyten vorliegen.

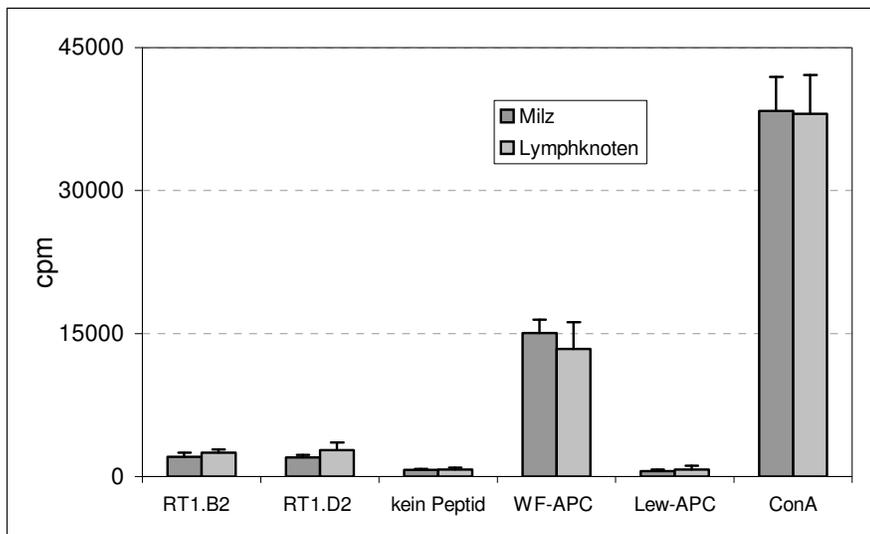


Abb.4.2.3.2a T-Zell-Reaktivität in Milz und Lymphknoten nach Immunisierung mit dem Peptid RT1.B2 an den Tagen 20 und 27 nach Nierentransplantation (n=4)

Nach Sensibilisierung mit dem Peptid RT1.D2 lassen sich hingegen spezifische, reaktive Zellen gegen dieses Peptid nachweisen. Wie in Abbildung 4.3.2.3b dargestellt, findet ausschließlich eine signifikante Antwort gegen das Peptid RT1.D2 (Peptid RT1.D2: Milz 14.776 ± 2.599 cpm und zervikale Lymphknoten 15.521 ± 1.377 cpm; jeweils $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptid: Milz 661 ± 125 cpm und zervikale Lymphknoten 741 ± 231 cpm). Zum Zeitpunkt der Abstoßung lassen sich sowohl in der Milz als auch in den peripheren Lymphknoten spezifische reaktive T-Lymphozyten gegenüber diesem Peptid nachweisen. Auch dieses Ergebnis unterstreicht die Immunogenität von Peptid RT1.D2.

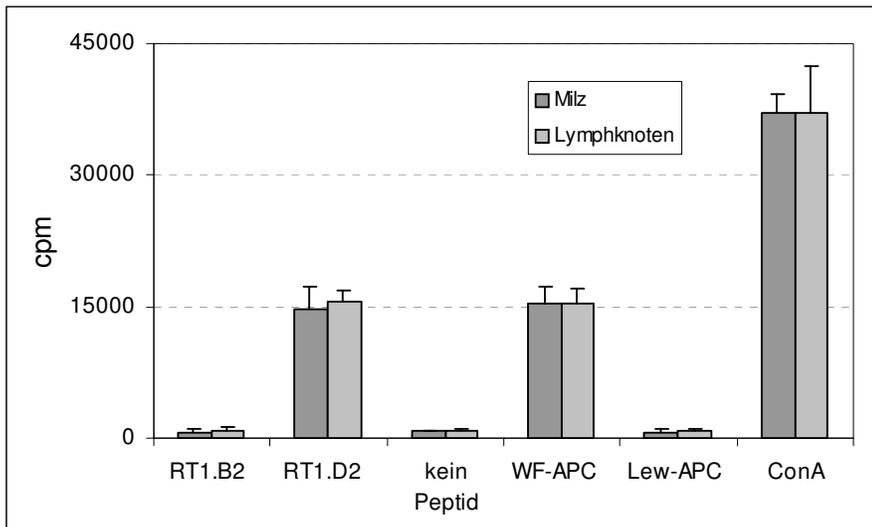


Abb.4.2.3.2b T-Zell-Reaktivität nach Immunisierung mit Peptid RT1.D2 an den Tagen 20 und 27 nach Nierentransplantation in Milz und Lymphknoten (n=4)

Bisher wurde gezeigt, dass in den Experimenten mit Peptid RT1.D2 und RT1.B2 deutliche Unterschiede bezüglich deren Immunogenität bestehen. Peptid RT1.D2 aktiviert spezifische T-Lymphozyten sehr stark und stellt sich somit als das immundominante Peptid heraus. Diese Beobachtungen gelten sowohl nach Dünndarm- als auch nach Nierentransplantation (Gp III und IV).

Ein entsprechendes Ergebnis bezüglich der T-Zell-Reaktivität wurde nach Immunisierung mit Peptid RT1.D2 (Gp I) und Peptid RT1.B2 (Gp II), also den Versuchsgruppen mit präoperativer Peptid-Immunisierung, nach Nierentransplantation gefunden.

4.2.4 Zytokinexpression nach Peptidapplikation

Während im letzten Kapitel in der Phase der Abstoßung die Spezifität der aus Milz und Lymphknoten isolierten T-Lymphozyten im indirekten Proliferations-Assay analysiert wurde, wird hier die Untersuchung der Zytokinexpression behandelt. Zum einen wurde das Zytokinmuster im Transplantat mit dem RNase-Protektions-Assay, zum anderen die Zytokinexpression von Milz-T-Lymphozyten im ELISA oder in der RT-PCR bestimmt. Auch hier wird der Effekt postoperativ applizierter Peptide in den Gruppen III (RT1.D2) und IV (RT1.B2) sowohl für dünn darm- als auch für nierentransplantierte Tiere untersucht. Im RNase Protektions-Assay kann die Genexpression verschiedener ausgewählter Zytokine detektiert werden.

Hierbei wurden, wie auch bei den Langzeittransplantaten, verschiedene Th₁- oder Th₂-typische und inflammatorische Zytokine in Transplantaten abstoßender Tiere untersucht. Als Beispiel dienen die Zytokinmuster akut abstoßender Tiere nach Nierentransplantation und Immunisierung mit Peptid RT1.D2 (Abb. 4.2.4 a,b) oder Peptid RT1.B2 (Abb. 4.2.4 c,d) im RNase-Protektions Assay.

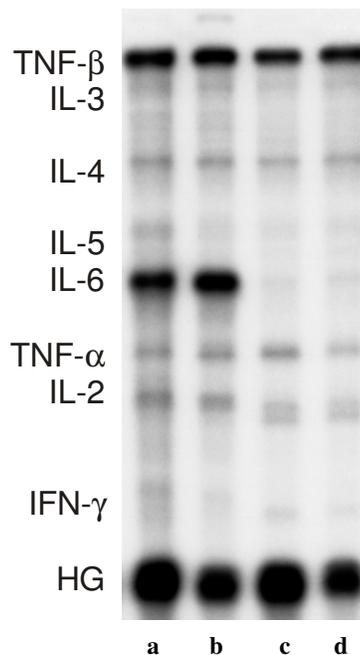


Abb. 4.2.4
Zytokinmuster akut abstoßender Tiere nach Nierentransplantation und Immunisierung mit Peptid RT1.D2 (a,b) oder Peptid RT1.B2 (c,d) im RNase-Protektions Assay. (a-d entsprechen jeweils einem Versuchstier. HG = housekeeping gene)

4.2.4.1 Zytokinexpression der akuten Abstoßung nach Nierentransplantation

Die Transplantate wurden zum Zeitpunkt der akuten Abstoßung im RNase-Protektions Assay auf deren Zytokinexpression hin untersucht (Abb. 4.2.4.1a).

In Abb. 4.2.4.1 ist die Zytokinexpression nach Immunisierung mit Peptid RT1.B2 oder Peptid RT1.D2 dargestellt, wobei, abhängig vom verwendeten Peptid, deutliche Unterschiede festzustellen sind.

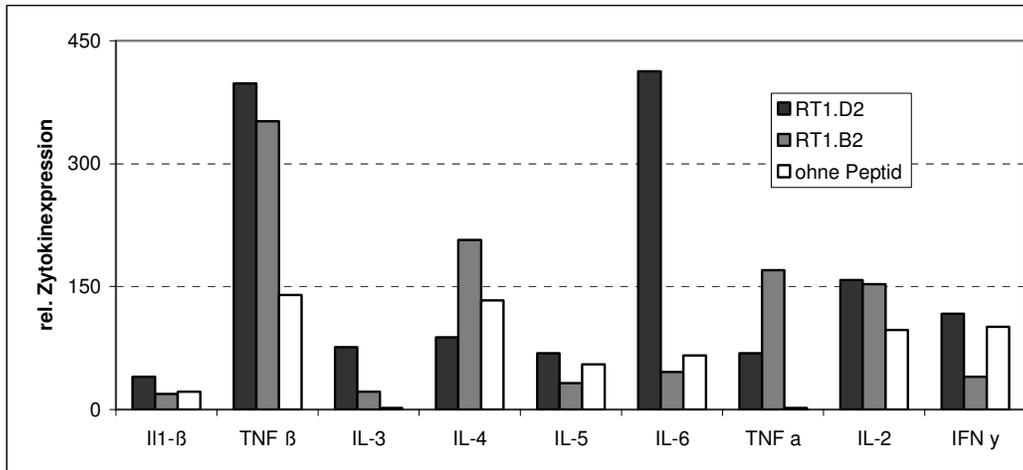


Abb. 4.2.4.1a Vergleich der Zytokinexpression im akut abgestoßenen Organ nach Immunisierung mit Peptid RT1.D2 oder RT1.B2 im Vergleich zur Kontrolle ohne Immunisierung mit Peptid (n=2 für jede Gruppe, dargestellt je ein repräsentativer Versuch).

Nach Immunisierung mit RT1.B2 ist eine deutliche Hochregulierung von TNF- β und IL-2 festzustellen, die mit der Zytokinexpression nach RT1.D2-Immunisierung vergleichbar ist. Unterschiede zwischen beiden Versuchstiergruppen fallen bei der Expression von IL-4, IL-6, TNF- α und IFN- γ auf. Findet eine Immunisierung durch das immundominante RT1.D2 statt, so sind IL-6 und IFN- γ stark exprimiert, wohingegen nach RT1.B2-Sensibilisierung mehr IL-4 und TNF- α detektiert werden. Um diese Unterschiede nicht nur im Transplantat nachzuweisen, wurden Milzzellen abstoßender Tiere im ELISA untersucht.

Zunächst wird die Zytokinbildung nach Nierentransplantation und postoperativer Immunisierung mit Peptid RT1.B2 dargestellt (Abb. 4.2.4.1b). Es wurden die charakteristischen Zytokine gegenüber RT1.B2 und die von der postoperativen Immunisierung unabhängige Antwort auf RT1.D2 im ELISA ermittelt. Milzzellen aus Tieren, die postoperativ mit Peptid RT1.B2 immunisiert wurden (Gp IV), produzierten nach Reaktivierung mit dem immundominanten Peptid RT1.D2 oder Peptid RT1.B2 IFN- γ (184 ± 11 vs 59 ± 7 pg/ml), IL-2 (125 ± 7 vs 60 ± 6 pg/ml), IL-4 (102 ± 19 vs 42 ± 9 pg/ml) und IL-10 (193 ± 7 vs 85 ± 4 pg/ml).

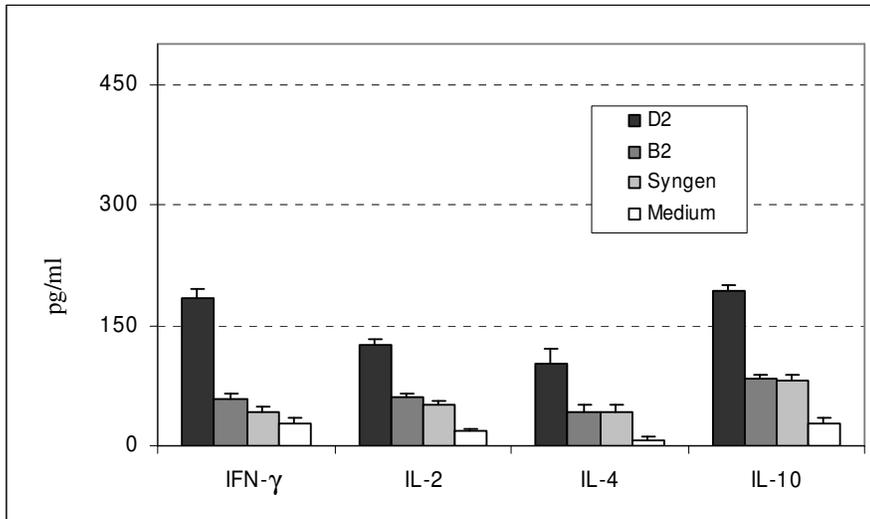


Abb. 4.2.4.1b Nachweis von Zytokinen in den Überständen von Milzzellen akut abstoßender Tiere nach Nierentransplantation und postoperativer Immunisierung mit Peptid RT1.B2 im Vergleich zur syngenigen Kontrolle im ELISA (n=4).

Nach Immunisierung mit dem Peptid RT1.B2 wurde in den Überständen eine signifikant höhere Expression von IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 bei Testung gegen RT1.D2 versus RT1.B2 nachgewiesen. Insgesamt wurde eine geringere Zytokinmenge als nach Immunisierung mit RT1.D2 gemessen (Abb. 4.2.4.1c, n=4).

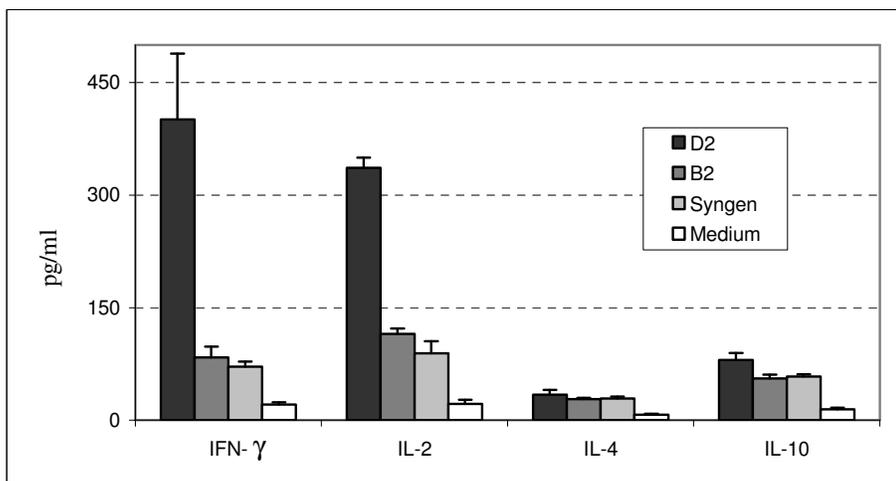


Abb. 4.2.4.1c Nachweis von Zytokinen in den Überständen von Milzzellen akut abstoßender Tiere nach Nierentransplantation und postoperativer Immunisierung mit Peptid RT1.D2 im Vergleich zur syngenigen Kontrolle im ELISA (n=4).

Im Gegensatz dazu wurde bei nierentransplantierten Tieren nach Sensibilisierung mit dem immundominanten Peptid RT1.D2 (Gp III) bei Testung in vitro mit Peptid RT1.D2 oder RT1.B2 im Überstand deutlich erhöht IFN- γ (401 ± 87 vs 84 ± 15 pg/ml) und IL-2 (337 ± 13 vs 115 ± 7 pg/ml), jedoch vermindert IL-4 (34 ± 12 vs 28 ± 2 pg/ml) und IL-10 (80 ± 10 vs 56 ± 6 pg/ml) nachgewiesen (Abb. 4.2.4.1c, n=4).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass durch Immunisierung mit dem immundominanten Peptid RT1.D2 relevante inflammatorische Mediatoren, nämlich IL-2 und IFN- γ , verstärkt exprimiert werden, die mit der Phase der akuten Abstoßung des Transplantats korrelieren. Die Immunogenität dieses Peptids spiegelt sich somit auch im Zytokinmuster wider.

4.2.4.2 Zytokinexpression der akuten Abstoßung nach Dünndarmtransplantation

Die Zytokine, die zum Zeitpunkt der akuten Abstoßung im Transplantat detektiert wurden, werden in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 4.2.4.2).

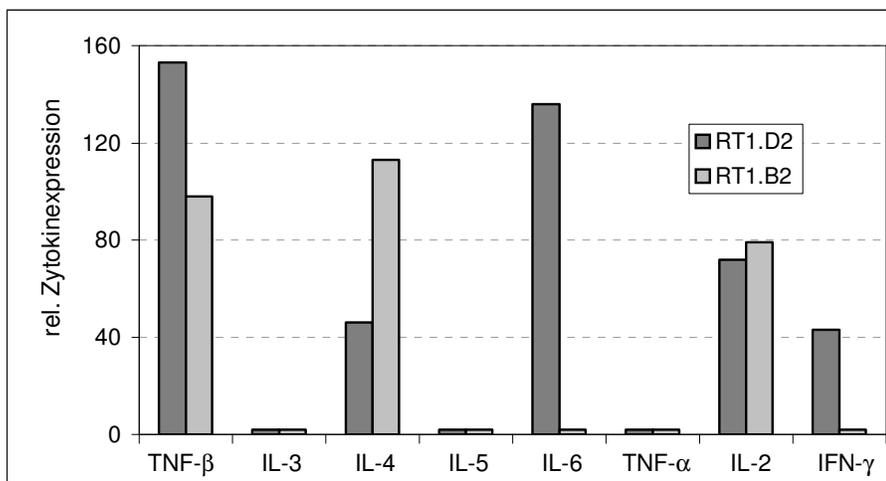


Abb. 4.2.4.2a Vergleich der Zytokinexpression nach Dünndarmtransplantation und postoperativer Immunisierung mit dem Peptid RT1.B2 oder RT1.D2 (n=2 für jede Gruppe).

Ähnlich wie im akut abgestoßenen Nierentransplantat ist im abgestoßenen Dünndarm nach Immunisierung mit dem Peptid RT1.B2 eine relativ starke Expression von TNF- β ,

IL-2 und IL-4 festzustellen. Hingegen findet nach Immunisierung mit RT1.D2 eine Hochregulation von TNF- β , IL-2, 4, 6 und IFN- γ statt. Besonders auffällig ist der bereits nach Nierentransplantation beobachtete Zusammenhang einer starken Genexpression von IL-6 und IFN- γ nach RT1.D2-Immunisierung sowie die verhältnismäßig starke Expression von IL-4 und weniger IFN- γ nach Immunisierung mit Peptid RT1.B2. Da bei den nicht immunisierten Tieren keine Abstoßung erfolgte, kann an dieser Stelle auf die Ergebnisse in Abb. 4.2.2.3 als Kontrolle ohne Peptid verwiesen werden.

Diese Tendenz soll weiter in Milzzellen akut abstoßender Tiere mittels RT-PCR semiquantitativ analysiert werden.

Tab. 4.2.4.2b Zytokinexpression in Milzzellen bei akut abstoßenden Tieren nach RT1.D2- oder RT1.B2-Immunisierung; - entspricht keiner, + einer schwachen, ++ einer stärkeren und +++ einer besonders starken Genexpression in der RT-PCR (n=4 je Gruppe)

| Gruppe | Zytokinexpression | | |
|--------------|-------------------|------|---------------|
| | IL-2 | IL-4 | IFN- γ |
| III (RT1.D2) | +++ | - | +++ |
| IV (RT1.B2) | + | + | ++ |

Nach Immunisierung mit Peptid RT1.D2 wurde eine hohe Genexpression für IL-2 und IFN- γ gefunden, es konnte jedoch keine IL-4 Expression nachgewiesen werden. Nach Immunisierung mit RT1.B2 wird vergleichsweise weniger IL-2 und IFN- γ gebildet, dafür jedoch IL-4 nachgewiesen. Erneut erweist sich das Peptid RT1.D2 als das immundominante Peptid mit einer charakteristischen starken Genexpression für IL-2 und IFN- γ .

4.2.5 H.E.-Histologie nach Peptidapplikation

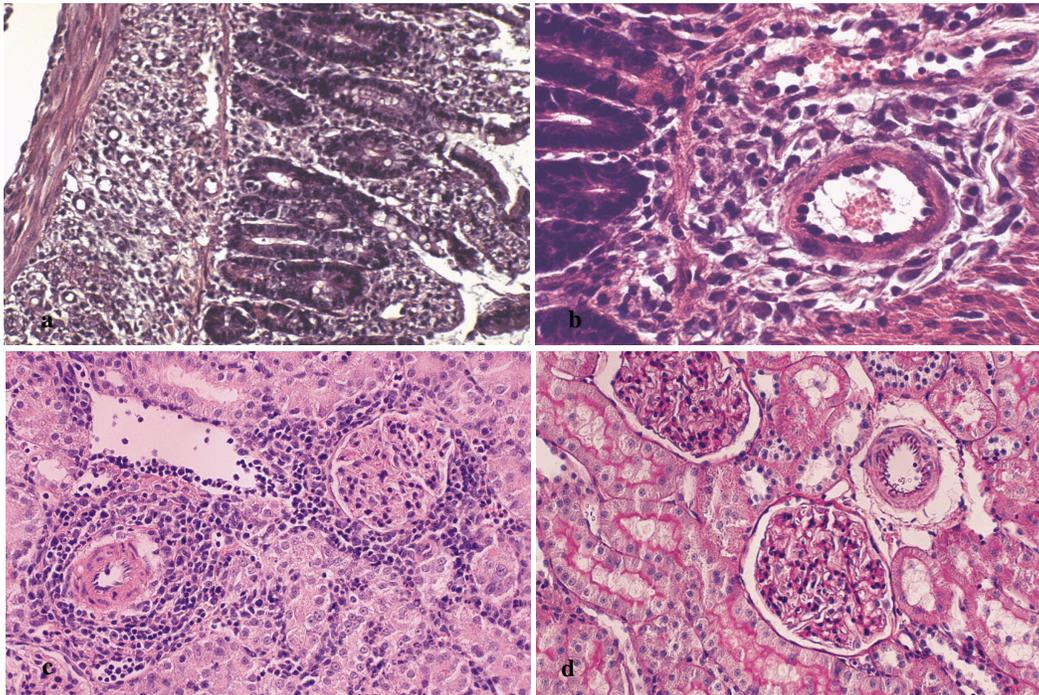


Abb. 4.2.5 H.E.-Histologie Dünndarmtransplantate in der Phase der akuten Abstoßung der nach Peptid- Sensibilisierung, a: Dünndarmzotten und Submukosa (200x), b: Gefäß der Submukosa (400x); PAS- Histologie der Nierentransplantate, c: in der Phase der akuten Abstoßung nach Peptid-Sensibilisierung (400x) und d: syngene Kontrolle nach Nierentransplantation (400x)

Histologisch lassen sich im Dünndarmtransplantat deutliche Zeichen der akuten Abstoßung finden. Die Dünndarmzotten sind stark abgeflacht und verplumpt (Abb.4.2.5a). Es zeigt sich eine deutliche Zellinfiltration in Mukosa und Submukosa, die von den Gefäßen der Submukosa aus infiltrieren (Abb. 4.2.5b).

Nach Nierentransplantation lassen sich in der Phase Abstoßung nach Peptid-Sensibilisierung in den Transplantaten typische Zeichen der akuten Abstoßung nachweisen; neben einer starken tubulären Nekrose liegt eine starkes zelluläres Infiltrat vor, das von den Gefäßen ausgeht und die Glomeruli befällt.

4.2.6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass sich das Peptid RT1.D2 als immundominantes Peptid herausstellt. Die Immundominanz dieses synthetischen Allo-MHC-Klasse-II-Peptids spiegelt sich in der deutlich beschleunigten Abstoßung nach Immunisierung mit diesem Peptid sowie in der Nachweisbarkeit aktivierter spezifischer T-Lymphozyten wider. Darüber hinaus wird nach Immunisierung mit dem Peptid RT1.D2 eine hohe Genexpression inflammatorischer Mediatoren (IL-2 und IFN- γ) beobachtet – ein weiteres Indiz der Immunogenität dieses Peptids.

Auch nach Immunisierung mit dem Peptid RT1.B2 kann eine Abstoßung induziert werden. Es lassen sich jedoch keine spezifischen T-Lymphozyten gegen dieses Peptid nachweisen und auch die Expression inflammatorischer Zytokine fällt geringer aus.

Hingegen wurde im Toleranzstadium auf T-Zell-Ebene eine Nicht-Reaktivität gegenüber RT1.D2 beobachtet. Desweiteren war die Zytokinexpression aller analysierten Zytokine stark vermindert oder sogar im Transplantat nicht nachweisbar.

5. Beantwortung der Fragen

1. Können synthetische MHC-Klasse-II-Peptide T-Lymphozyten aktivieren? Sind sie zur Detektion spezifischer T-Lymphozyten im indirekten Proliferations-Assay geeignet?

Von den vier aus dem MHC-Klasse-II-Molekül der Wistar-Furth-Ratte stammenden getesteten MHC-Klasse-II-Peptiden ist Peptid RT1.D2 immundominant. Die Immunisierung mit diesem Peptid führt zur starken Aktivierung spezifischer T-Lymphozyten, die im indirekten Proliferations-Assay mit diesem Peptid reaktivierbar und damit nachweisbar sind. Auch die Immunisierung mit WF-Zellen, d.h. mit MHC-Klasse-II-Molekülen, aktiviert spezifische T-Lymphozyten, von denen einige das immundominante Peptid RT1.D2 im Detektionssystem erkennen. Dies bedeutet, dass auch durch die in vivo-Prozessierung der MHC-Klasse-II-Moleküle Peptidprodukte entstehen, die gleiche Subpopulationen von T-Lymphozyten aktivieren wie auch das synthetische Peptid RT1.D2. Mit dem indirekten Proliferations-Assay werden ausschließlich aktivierte T-Lymphozyten detektiert, so dass dieser Assay als Detektionssystem zum Nachweis allopeptid-spezifischer T-Lymphozyten nach Transplantation eingesetzt werden kann.

2. Beeinflussen synthetische MHC-Klasse-II-Moleküle das Transplantat-Überleben? Kommt somit dem indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung in der akuten Abstoßung eine Bedeutung zu?

Durch die präoperative oder postoperative Applikation synthetischer MHC-Klasse-II-Peptide wurde eine akute Transplantatabstoßung eingeleitet. Die beschleunigte Transplantatabstoßung konnte am deutlichsten nach Applikation des immundominanten Peptids RT1.D2 beobachtet werden. Somit ist der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung, über den auch die synthetischen Peptide präsentiert werden, bereits zum Zeitpunkt der akuten

Transplantatabstoßung neben dem direkten Weg der Allo-Antigenerkennung von Relevanz.

3. Wodurch wird das Stadium der akuten Abstoßung nach Applikation von Peptid RT1.RT1.B oder RT1. RT1.D2 charakterisiert?

Histologisch lässt sich die akute Abstoßung des Dünndarms durch eine starke Zellinfiltration sowie Abflachung und Verplumpung der Zotten belegen. Im abgestoßenen Nierentransplantat liegt ein starkes zelluläres Infiltrat der Glomeruli vor; daneben findet man eine starke tubuläre Nekrose.

Nach Applikation des immundominanten Peptids RT1.D2 werden im Stadium der akuten Abstoßung spezifische T-Lymphozyten nachgewiesen, die eine beschleunigte Abstoßung einleiten. Zu diesem Zeitpunkt werden verschiedene für die Abstoßung charakteristische Zytokine exprimiert. Nach Immunisierung mit dem immundominanten Peptid RT1.D2 ist eine erhöhte Gen-Expression von IL-2 , IL-6 und IFN- γ sowohl im Dünndarm- als auch im Nierentransplantat messbar. Für beide Transplantate fällt die Expression dieser Zytokine nach Immunisierung mit dem Peptid RT1.B2 geringer aus, jedoch wird eine verstärkte Expression für IL-4 gefunden. Dies lässt darauf schließen, dass die Zytokinexpression organübergreifend wesentlich von der Sensibilisierung mit dem jeweiligen Peptid abhängt.

4. Ist das Stadium der Toleranz durch eine veränderte T-Zell-Reaktivität oder eine veränderte Zytokinexpression charakterisiert?

Die Toleranz nach allogener Dünndarmtransplantation ist charakterisiert durch die Nicht-Reaktivität gegenüber dem immundominanten MHC-Klasse-II-Peptid RT1.D2. Dies lässt sich an Hand der Ergebnisse des Proliferations- und des DTH-Assays belegen. Bei toleranten Tieren konnte im Dünndarmtransplantat nur das Zytokin TNF- β nachgewiesen werden, das aber in der Stärke der

Expression einer syngen operierten Kontrolle entsprach. Histologisch zeigten sich keine Zeichen der Abstoßung.

5. Unterscheiden sich die peptidinduzierten Effekte nach Dünndarmtransplantation von denen nach Nierentransplantation? Welche Rolle spielt das transplantierte Organ?

Sowohl nach Nieren- als auch Dünndarmtransplantation beschleunigte die prä- bzw. postoperative Immunisierung mit dem immundominanten Peptid RT1.D2 die Transplantabstoßung. Das immundominante Peptid RT1.D2 führt also in jedem Fall, unabhängig vom transplantierten Organ, zu einer beschleunigten Abstoßung. Das weniger immunogene Peptid RT1.B2 kann nur in Kombination mit einem sehr immunogenen Organ, wie dem Dünndarm, eine Abstoßung induzieren.

6. Diskussion

6.1 Wege der Allo-Antigenerkennung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die peptid-induzierte T-Zell-Proliferation in vivo und in vitro charakterisiert. Die Ergebnisse belegen, dass die Sensibilisierung mit einem immunogenen synthetischen Peptid spezifische T-Lymphozyten in vivo aktiviert. Peptid-spezifische T-Lymphozyten lassen sich anschließend im indirekten Proliferations-Assay mit diesem Peptid reaktivieren und somit nachweisen. Zusätzliche Bedingung für eine Reaktivierung in vitro ist die Präsentation synthetischer Peptide über eigene antigenpräsentierende Zellen. Dem indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung liegt die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor von Empfänger-T-Lymphozyten und einem Allo-Peptid auf dem Empfänger-MHC-II-Komplex einer antigenpräsentierenden Zelle zu Grunde [81] (Abb. 1). Da im indirekten Proliferations-Assay ausschließlich aktivierte T-Lymphozyten proliferieren, kann dieser als in vitro-Detektionssystem für in vivo aktivierte T-Lymphozyten verwendet werden.

Nach Transplantation nehmen sowohl der indirekte als auch der direkte Weg der Allo-Antigenerkennung eine Schlüsselfunktion bei der Transplantatabstoßung ein [82-85]. Aktivierte T-Lymphozyten sind Voraussetzung für die Transplantatabstoßung [81,84,86-89]; dies wurde insbesondere durch Versuche mit T-Zell-defizienten Mäusen bewiesen [90,91], die nicht in der Lage waren, ein transplantiertes Organ abzustößen. T-Lymphozyten sind fähig, zwischen selbst und fremd (allogen) zu unterscheiden [92-95]. Beim indirekten Weg werden Spender-MHC-Moleküle prozessiert und in einer Länge von 13-24 Aminosäuren auf dem MHC-Klasse-II-Komplex der eigenen antigenpräsentierenden Zelle präsentiert, ein Vorgang, der außer bei der Transplantation auch bei der T-Zell-Erkennung weiterer Peptid-Antigene vorkommt [96,97]. Der direkte und der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung werden mit verschiedenen Phasen der Transplantatabstoßung in Verbindung gebracht. Im Vergleich zu der Zahl an T-Lymphozyten, die nach der Transplantation über den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung aktiviert werden, liegt die Zahl der T-Lymphozyten, die den direkten Weg nach Transplantation einleiten, 10-100mal höher [98]. Daher wird dem akuten Zeitpunkt der Transplantatabstoßung häufig der direkte Weg der Allo-Antigenerkennung zugeschrieben [84,85]. Voraussetzung für den direkten Weg sind

„passenger“-Leukozyten (APCs), da nur sie über das benötigte kostimulatorische Signal der T-Zell-Aktivierung verfügen [50]. 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 [82], wodurch der direkte Weg der Allo-Antigenerkennung in den Hintergrund tritt [83,99,100]. Somit spielt der direkte Weg der Allo-Antigenerkennung während der frühen Transplantatabstoßung eine wichtige Rolle.

Dem indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung wird dagegen eine dominante Rolle bei der chronischen Transplantatabstoßung [84] und der DTH-Antwort [101-105] zugewiesen [84,87-89,106-108]. Für den Menschen wurde aber bereits gezeigt, dass auch für die akute Abstoßung der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung eine bedeutende Rolle spielt [109]; in dieser Arbeit wurde dasselbe am Rattenmodell belegt.

6.2 Modulation der Immunantwort durch synthetische MHC-Peptide

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass synthetische MHC-Klasse-II-Peptide über den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung eine T-Zell-Proliferation induzieren. Synthetische Peptide können aber auch den direkten Weg, über den die Empfänger-T-Lymphozyten mit dem intakten MHC-Klasse-I- oder -II-Molekül der Spenderzellen in Kontakt treten, inhibieren [110]. Da jedoch der direkte Weg der Allo-Antigenerkennung nur in der frühen Phase der Abstoßung von Relevanz ist, wurde in dieser Arbeit der indirekte Weg näher analysiert.

In vivo können MHC-Klasse-I- und -II-Peptide die Immunantwort modulieren [76,101,111-113]; ihre Relevanz wurde bereits für die Transplantatabstoßung beschrieben [49]. Diesen Peptiden kommt unterschiedliche immunologische Bedeutung zu: So wurde durch ein MHC-Klasse-I-Peptid der Maus (Aminosäurepositionen 163-174 aus der α_2 -Domäne) eine Blockierung des T-Zell-Rezeptors beobachtet, wodurch es nicht zur Lyse der Ziel-Zellen kam [114]. Für die humanen Peptide HLA-B7.75-84 und HLA-B2702.75-84 (Allotrap) aus der α_1 -Kette wurde beschrieben, dass sie die Differenzierung der NK- und CD8⁺-Zellen verhindern [115]. Die Therapie mit Allotrap führt aber nicht nur beim Menschen zu einer Verminderung der NK-Reaktivität,

sondern auch bei Ratten und Mäusen [116-118]. Dem Anspruch einer transplantatspezifischen Inhibition des Immunsystems wird Allotrap nicht gerecht, vielmehr bewirkt es eine, wenn auch v.a. auf NK-Zellen ausgerichtete, allgemeine Unterdrückung des Immunsystems [119]. So bleibt auch unter dieser Therapie eine erhöhte Infektionsgefahr und ein gesteigertes Risiko der Tumorbildung bestehen.

Bei der indirekten Allo-Antigenerkennung spielt für die Immunantwort das Allo-Peptid die entscheidende Rolle. Bei absoluter Kompatibilität zwischen Spender- und Empfänger-MHC, wie man sie nur bei eineiigen Zwillingen vorfindet, wird das Immunsystem nicht aktiviert; hingegen wird mit zunehmender Inkompatibilität eine stärkere Immunantwort beobachtet. In unseren Versuchen wurden verschiedene Allo-Peptide aus dem MHC-Klasse-II-Komplex charakterisiert, um deren Immunogenität zu analysieren. Wie im Rahmen dieser Arbeit durch die unterschiedlichen immunologischen Effekte nach RT1.B2- oder RT1.D2-Immunisierung belegt wurde, beeinflussen schon geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz verschiedener Allo-Peptide deren Immunogenität – RT1.D2 und RT1.B2 unterscheiden sich in acht Aminosäuren. Nur das Peptid RT1.D2 löste eine deutliche T-Zell-Aktivierung aus, was die hohe Immunogenität dieses Peptids belegt. Vergleichsweise gering war die Antwort gegenüber dem Peptid RT1.B2, unserem Kontrollpeptid aus der β -Kette der WF-MHC-Moleküls. Peptide aus der α -Kette, RT1.B3 und RT1.D3, zeigten keine Reaktivität.

Diese Unterschiede werden auch nach Transplantation deutlich. Sowohl die präoperative als auch die postoperative Applikation des immundominanten RT1.D2-Peptids führte im Dünndarm- und Nierenmodell zu einer beschleunigten akuten Abstoßung, während nach Applikation des weniger immunogenen RT1.B2-Peptids nur nach Transplantation des Dünndarms, eines sehr immunogenen Transplantats, eine Abstoßung induziert werden konnte. Die Immunogenität des transplantierten Organs beeinflusst also auch die Effektivität der Peptidapplikation. In unseren Versuchen wurde gezeigt, dass sowohl nach Nieren- als auch nach Dünndarmtransplantation über den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung mit synthetischen MHC-Klasse-II-Peptiden aktivierte T-Lymphozyten eine spezifische Immunantwort gegen ein Organ mit diesem MHC-Komplex auslösen können. Die Bedeutung dieser Peptide entsprechen den

Erkenntnissen aus einem Herzmodell, in dem die gleichen Peptide verwendet wurden [120].

6.3 Grundlagen der Toleranzentwicklung

Die Toleranzentwicklung gegenüber einem Allo-Antigen wird als erworbene oder optionale Toleranz bezeichnet [121]. Toleranz wird als Abwesenheit einer Immunantwort auf ein Antigen bei gleichzeitig bestehender Reaktivität gegenüber anderen Antigenen definiert [122]. Für die Entwicklung einer erworbenen Toleranz sind unterschiedliche Faktoren wichtig [123]. So spielen der Applikationsweg des Antigens, die Form des Antigens und auch der Genotyp des Empfängers eine wichtige Rolle [97]. Nach intravenöser Peptidapplikation wurde bereits die Induktion von Toleranz bei adulten Ratten beobachtet [124]. Ebenso wurde nach intrathymischer Applikation immunogener Peptide [125,126], nicht jedoch bei Verabreichung nicht-immunogener Peptide, Toleranz erzeugt [127,128]. Ziel könnte sein, in Zukunft eine Verminderung der Immunantwort über synthetische Peptide zu erreichen, die zur Verhinderung der Transplantatabstoßung beiträgt. Diese Wege lassen sich aber bisher klinisch nicht realisieren. Bei den meisten zu transplantierenden Patienten ist zum einen der Thymus nur noch rudimentär vorhanden, zum anderen liegt keine Vorstellung über zu verwendende Dosen für eine effektive Peptidbehandlung vor.

Dallman beschrieb die Milz als zentrales Organ für die Toleranzentwicklung [124], Sayegh charakterisierte den oralen Weg [129]. Weitere Wege, wie die intravenöse Beladung von antigenpräsentierenden Zellen oder das intraperitoneale Immunisieren, werden diskutiert [130]. Klinisch werden diese Wege bereits bei Erkrankungen wie multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis oder Diabetes mellitus Typ I getestet [131].

Als wichtigste Ebene für die Nicht-Reaktivität werden B- und T-Lymphozyten diskutiert [132]. Die DTH-Reaktion oder der indirekte Proliferations-Assay spiegeln die T-Zell-Reaktivität eines Organismus gegen Allo-Antigene wider [127,128], wobei Toleranz mit einer Nicht-Reaktivität gegenüber einem Allo-Antigen einhergeht. Dies belegt auch diese Arbeit. Zunächst wurde bei der Planung der Transplantationsversuche nicht erwartet, dass nach Dünndarmtransplantation und kurzzeitiger Immunsuppression Langzeittoleranz entstehen würde, da dies bisher in der Literatur noch nicht beschrieben

wurde. Als sich jedoch zeigte, dass die überwiegende Mehrzahl der Empfänger der Gruppe V nach Dünndarmtransplantation ein Langzeittransplantatüberleben entwickelte (vier von fünf Tieren), wurden Versuche geplant, die eine spezifische Transplantattoleranz belegen. Eine DTH-Antwort gegenüber dem immundominanten Peptid RT1.D2 war bei toleranten Tieren nicht mehr nachweisbar. Außerdem lag auch im indirekten Proliferations-Assay keine Reaktivität mehr gegen dieses Peptid vor. Darüber hinaus wurde bei diesen Tieren ein zusätzlich transplantiertes WF-Spenderherz oder WF-Spenderhaut, die dem Rattenstamm des Ersttransplantats entsprachen, dauerhaft toleriert. Transplantierte Organe von einem Drittstamm (BN) wurden jedoch akut abgestoßen; dies belegt die bestehende Immunkompetenz des Empfängerorganismus gegenüber Antigenen und die selektive Toleranz gegenüber den WF-Antigenen.

6.4 Einfluss von Zytokinen auf das Transplantatüberleben

Eine Verminderung der Spiegel von IL-2 und IFN- γ bei gleichzeitigem Anstieg von IL-4 wurde nach oral induzierter Toleranz beobachtet [131]. Dieses Zytokinmuster wurde bereits in anderen Studien im Zusammenhang mit Immuntoleranz beschrieben [133]. Langzeitüberleben wird häufig mit einer Immundelevation in Verbindung gebracht, d.h. einem Wechsel vom Th₁- zum Th₂-Zytokinmuster [62]. Klassische Th₂-Zytokine sind IL-4, IL-5 und IL-10, die sowohl die Th₁-Antwort inhibieren als auch B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen [58]. Die neonatale Immunität [134-137] und auch die orale Toleranz [138] wurden mit diesen Th₂-Zytokinen in Verbindung gebracht. Für den adulten Organismus wird jedoch eine kontroverse Meinung vertreten: die einen Forscher postulieren eine Toleranz induzierende Wirkung der Th₂-Zytokine [75], wohingegen andere eine Beschleunigung der Transplantatabstoßung bei diesem Zytokinmuster beobachteten [139,140]. In den Transplantaten der toleranten Tiere nach Dünndarmtransplantation wurde in dieser Arbeit weder ein Th₁- noch ein Th₂-Zytokinmuster festgestellt; die Zytokinexpression entsprach der syngener Kontrollen. Es kann somit nicht eindeutig geklärt werden, ob TH₂-Zytokine an der Entstehung des Toleranzstadiums beteiligt sind.

Im Gegensatz dazu werden Th₁-Zellen der Abstoßung zugeordnet. Durch Ausschüttung typischer Th₁-Zytokine wie IL-2 und IFN- γ werden transplantierte Gewebe über die Stimulation sekundärer Effektor-Zellen wie Makrophagen, NK-Zellen und B- und T-Lymphozyten (Abb. 1) zerstört [56,58,59]. Diese Beobachtung wird auch an Hand unserer Ergebnisse aus ELISA, RT-PCR und RNase Protektions-Assay bestätigt. Die Arbeit belegt, dass bei der akuten Abstoßung organübergreifend die Th₁-Antwort deutlich dominiert, Th₂-typische Zytokinmuster jedoch eine begleitende Rolle spielen.

Wie bereits für humane und murine Leukozyten gezeigt wurde, produzieren indirekt aktivierte CD4⁺-Zellen IL-2 [19,53,141]. In unseren Versuchen erhöhte sich nach Immunisierung mit Peptid RT1.D2 der Anteil aktivierter CD4⁺-Zellen; dies äußert sich in einer verstärkten Expression von IL-2-Rezeptoren. Die Stimulation dieser CD4⁺-Zellen führt dann, abhängig von den Zytokinen, die nach Stimulation freigesetzt werden, zu einer Vervielfältigung der Allo-Antwort. Auf diese Weise aktivierte sekundäre Effektor-Zellen können eine zelluläre Transplantatabstoßung hervorrufen oder eine Antikörperproduktion in Gang bringen [103,104,142,143].

Daneben wiesen die Zytokin-Untersuchungen nach Transplantation darauf hin, dass synthetische Peptide ein charakteristisches Zytokinmuster aktivieren können. Nach Immunisierung mit dem Peptid RT1.D2 wird eine hohe Genexpression für IFN- γ , IL-2 und IL-6 gefunden, die mit einer deutlich beschleunigten Transplantatabstoßung einhergehen. Vergleichsweise gering war die Genexpression dieser Zytokine nach Immunisierung mit dem Peptid RT1.B2, bei dem jedoch höhere Werte für IL-4 gemessen wurden. In früheren Studien mit T-Zell-Klonen aus Langzeit-überlebenden LEW-Empfängern mit WF-Nierentransplantat und akut abstoßenden Empfängern gegen das immundominante Spender-MHC-Peptid RT1.D2 wurde bereits gezeigt, dass das Vorhandensein bestimmter Zytokine mit der An- oder Abwesenheit dieser Klone korreliert [144,145].

Unabhängig vom übertragenen Organ verdeutlicht der Vergleich der Zytokinmuster, dass die Immunisierung mit dem immundominanten Peptid RT1.D2 verglichen mit dem Peptid RT1.B2 mit einer beschleunigten akuten Abstoßung einhergeht, was sich mit früheren Ergebnissen eines Herzmodells deckt [120, 146].

6.5 Ausblick

Insgesamt charakterisiert diese Arbeit die Rolle synthetischer MHC-Klasse-II-Peptide sowohl für den akuten Zeitpunkt als auch für den spät-akuten Zeitpunkt der Abstoßung. Die Arbeit zeigt, dass das Immunsystem beim Dünndarm als besonders immunogenem Transplantat sehr sensibel auf äußere Stimuli reagiert. Daraus ergibt sich eine besonders hohe Gefahr der akuten Abstoßung nach Dünndarmtransplantation und die Notwendigkeit einer sorgfältigen postoperativen Expositionsprophylaxe gegen jede Antigeneinwirkung.

Heutige Therapieformen können dem Anspruch einer spezifischen Unterdrückung des Immunsystems gegenüber dem Transplantat bislang nicht gerecht werden. In dieser Arbeit wurde aufgezeigt, dass der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung bereits zu einem frühen Zeitpunkt bei der Transplantatabstoßung von Bedeutung ist. Diese Arbeit zeigt, dass die Allo-Immunantwort über den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung moduliert werden kann. Daher erscheint dieser Weg geeignet, um mit synthetischen Peptiden in Verbindung mit einer konventionellen Immunsuppression modulatorisch in das Immunsystem einzugreifen. Dies kann beispielsweise durch Beeinflussung des Zell-Zyklus oder der Signaltransduktion oder auch durch Induktion von Apoptose erfolgen. Ziel ist dabei die spezifische Modulation des Immunsystems und letztlich eine Transplantattoleranz.

7. Zusammenfassung

Die Transplantatabstoßung wird durch T-Lymphozyten des Empfängers ausgelöst, die Spender-MHC-Moleküle erkennen. In der Klinik wird in der Regel eine Immunsuppression durchgeführt, die sich auf alle T-Lymphozyten gleichermaßen auswirkt. Langfristiges Ziel muss es sein, ausschließlich die T-Lymphozyten zu unterdrücken, die an der Transplantatabstoßung beteiligt sind. Dazu ist es notwendig, die von diesen Zellen ausgelösten immunologischen Effekte zu charakterisieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass T-Lymphozyten über den indirekten Weg der Allo-Antigenerkennung von dem synthetischen Spender-spezifischen MHC-Klasse-II-Peptid RT1.D2 aktiviert werden. So aktivierte T-Lymphozyten erzeugen im Empfänger eine spezifische Immunantwort gegen das Transplantat. Sowohl die präoperative als auch die postoperative Applikation dieses Peptids führten im Dünndarm- und Nierenmodell zu einer beschleunigten akuten Abstoßung, während nach Applikation des weniger immunogenen RT1.B2-Peptids nur nach Transplantation des immunogenen Dünndarms eine Abstoßung induziert werden konnte.

Die Toleranz nach Dünndarmtransplantation zeichnet sich durch fehlende T-Zell-Reaktivität gegenüber dem immundominanten Peptid RT1.D2 aus, wie der DTH-Assay und der indirekte Proliferations-Assay bestätigen. Ebenso lässt sich keine erhöhte Zytokinexpression nachweisen.

Der Vergleich der Zytokinmuster nach RT1.B2- oder RT1.D2-Immunsierung verdeutlicht, dass nach Immunsierung mit dem immundominanten Peptid RT1.D2 unabhängig vom Organmodell die erhöhte Expression von IL-2 und IFN- γ mit einer beschleunigten akuten Abstoßung korreliert.

Diese Arbeit zeigt, dass der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung nach Transplantation auch schon zu einem frühen Zeitpunkt der Abstoßung von Bedeutung ist - eine Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz synthetischer Peptide. Daher kann der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze genutzt werden, bei denen synthetische Peptide mit Immunsuppression spezifisch in die Unterdrückung der Transplantatabstoßung eingreifen.

8. Literaturverzeichnis

1. Charbonnet P, Buhler L, Kadry Z, Majno P, Morel P. [Small intestine transplantation]. *Rev Med Suisse Romande*. 1997;117:337-41.
2. Kalo Z, Jaray J, Nagy J, Megyesi A, Hidvegi M. [Health prospects in the alternative strategies of renal replacement therapies]. *Orv Hetil*. 2000;141:1761-5.
3. Asfar S, Atkison P, Ghent C, Duff J, Wall W, Williams S, Seidman E, Grant D. Small bowel transplantation. A life-saving option for selected patients with intestinal failure. *Dig Dis Sci*. 1996;41:875-83.
4. Asderakis A, Augustine T, Dyer P, Short C, Campbell B, Parrott NR, Johnson RW. Pre-emptive kidney transplantation: the attractive alternative. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13:1799-803.
5. Whiting JF, Woodward RS, Zavala EY, Cohen DS, Martin JE, Singer GG, Lowell JA, First MR, Brennan DC, Schnitzler MA. Economic cost of expanded criteria donors in cadaveric renal transplantation: analysis of Medicare payments. *Transplantation*. 2000;70:755-60.
6. Hiyama DT. The current role of small-bowel transplantation in intestinal failure. *Nutr Clin Pract*. 1993;8:5-11.
7. Vanderhoof JA. Short bowel syndrome. *Clin Perinatol*. 1996;23:377-86.
8. Grant D. Current results of intestinal transplantation. The International Intestinal Transplant Registry. *Lancet*. 1996;347:1801-3.
9. Heeckt PF, Klein D, Beger HG. [Indications for total parenteral nutrition or small intestine transplantation?--Prognostic factors in short bowel syndrome]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*. 1996;113:389-93.
10. Vanderhoof JA, Langnas AN. Short-bowel syndrome in children and adults. *Gastroenterology*. 1997;113:1767-78.
11. Kocoshis SA. Small bowel transplantation in infants and children. *Gastroenterol Clin North Am*. 1994;23:727-42.
12. Carpenter CB. Long-term failure of renal transplants: adding insult to injury. *Kidney Int Suppl*. 1995;50:S40-4.

13. Cohen DJ, Benvenisty AI, Benstein JA, Reed EF, Ho E, Suci-Foca N, Hardy MA. Influence of HLA matching on kidney allograft survival: UNOS allocation system greatly improves the outcome. *Transplant Proc.* 1995;27:805-6.
14. Lagaaij EL, Hennemann IP, Ruigrok M, de Haan MW, Persijn GG, Termijtelen A, Hendricks GF, Weimar W, Claas FH, van Rood JJ. Effect of one-HLA-DR-antigen-matched and completely HLA-DR-mismatched blood transfusions on survival of heart and kidney allografts. *N Engl J Med.* 1989;321:701-5.
15. Suci-Foca N, Cohen DJ, Benvenisty AI, Benstein JA, Reed EF, Ho E, Hardy MA. Influence of HLA matching on kidney allograft survival. *Transplant Proc.* 1996;28:121-2.
16. Ploeg RJ, D'Alessandro AM. Intestinal transplantation: a clinical update. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1995;212:79-89.
17. Vella JP, Vos L, Carpenter CB, Sayegh MH. Role of indirect allorecognition in experimental late acute rejection. *Transplantation.* 1997;64:1823-8.
18. De Geest S, Borgermans L, Gemoets H, Abraham I, Vlaminck H, Evers G, Vanrenterghem Y. Incidence, determinants, and consequences of subclinical noncompliance with immunosuppressive therapy in renal transplant recipients. *Transplantation.* 1995;59:340-7.
19. Clerici M, Shearer GM. Differential sensitivity of human T helper cell pathways by in vitro exposure to cyclosporin A. *J Immunol.* 1990;144:2480-5.
20. Muluk SC, Clerici M, Via CS, Weir MR, Kimmel PL, Shearer GM. Correlation of in vitro CD4+ T helper cell function with clinical graft status in immunosuppressed kidney transplant recipients. *Transplantation.* 1991;52:284-91.
21. Henry ML. Cyclosporine and tacrolimus (FK506): a comparison of efficacy and safety profiles. *Clin Transplant.* 1999;13:209-20.
22. Pastural M, Lang P, Chopin D, Buisson C, Baron C, Salomon L, Fruchaud G, Hemery F, Dahmane D, Bentabet R, Grimbert P, Remy P, Abbou CC, Weil B. [Results of 25 years of kidney transplantation]. *Ann Urol (Paris).* 2000;34:352-8.
23. Matas AJ, Burke JF, Jr., DeVault GA, Jr., Monaco A, Pirsch JD. Chronic rejection. *J Am Soc Nephrol.* 1994;4:S23-9.

24. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int.* 1996;49:518-24.
25. Azuma H, Tilney NL. Chronic graft rejection. *Curr Opin Immunol.* 1994;6:770-6.
26. Penn I. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. *Clin Transpl.* 1994:99-109.
27. de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis.* 2000;35:333-46.
28. Schweitzer EJ, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Gores PF, Dunn DL, Sutherland DE, Najarian JS. Causes of renal allograft loss. Progress in the 1980s, challenges for the 1990s. *Ann Surg.* 1991;214:679-88.
29. Waaga AM, Gasser M, Laskowski I, Tilney NL. Mechanisms of chronic rejection. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:517-21.
30. Cuturi MC, Blacho G, Josien R, Souillou JP. The biology of allograft rejection. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1994;3:578-84.
31. Alegre ML, Lenschow DJ, Bluestone JA. Immunomodulation of transplant rejection using monoclonal antibodies and soluble receptors. *Dig Dis Sci.* 1995;40:58-64.
32. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol.* 1998;10:775-83.
33. Sayegh MH, Krensky AM. Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides. *Kidney Int Suppl.* 1996;53:S13-20.
34. Hernandez-Fuentes MP, Baker RJ, Lechler RI. The alloresponse. *Rev Immunogenet.* 1999;1:282-96.
35. Bach FH, Bach ML, Sondel PM. Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation. *Nature.* 1976;259:273-81.
36. Krensky AM, Clayberger C. The nature of allorecognition. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1993;2:898-903.

37. Opelz G, Wujciak T, Back D, Mytilineos J, Schwarz V, Albrecht G. [Effect of HLA compatibility on kidney transplantation]. *Infusionsther Transfusionsmed.* 1994;21:198-202.
38. Opelz G, Wujciak T. The influence of HLA compatibility on graft survival after heart transplantation. The Collaborative Transplant Study. *N Engl J Med.* 1994;330:816-9.
39. Smith JD, Rose ML, Pomerance A, Burke M, Yacoub MH. Reduction of cellular rejection and increase in longer-term survival after heart transplantation after HLA-DR matching. *Lancet.* 1995;346:1318-22.
40. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today.* 1990;11:83-8.
41. Krensky AM. The HLA system, antigen processing and presentation. *Kidney Int Suppl.* 1997;58:S2-7.
42. Rotzschke O, Falk K, Faath S, Rammensee HG. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J Exp Med.* 1991;174:1059-71.
43. Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol.* 1999;162:352-8.
44. Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:403-50.
45. Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci.* 1999;4:D476-80.
46. Sayegh MH. Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int.* 1999;56:1967-79.
47. Benichou G, Tam RC, Soares LR, Fedoseyeva EV. Indirect T-cell allorecognition: perspectives for peptide-based therapy in transplantation. *Immunol Today.* 1997;18:67-71.
48. Benichou G, Malloy KM, Tam RC, Heeger PS, Fedoseyeva EV. The presentation of self and allogeneic MHC peptides to T lymphocytes. *Hum Immunol.* 1998;59:540-8.
49. Sayegh MH, Carpenter CB. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol.* 1996;13:221-9.

50. Hornick PI, Mason PD, Yacoub MH, Rose ML, Batchelor R, Lechler RI. Assessment of the contribution that direct allorecognition makes to the progression of chronic cardiac transplant rejection in humans. *Circulation*. 1998;97:1257-63.
51. Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature*. 1988;336:79-81.
52. Lenschow DJ, Bluestone JA. T cell co-stimulation and in vivo tolerance. *Curr Opin Immunol*. 1993;5:747-52.
53. Via CS, Tsokos GC, Stocks NI, Clerici M, Shearer GM. Human in vitro allogeneic responses. Demonstration of three pathways of T helper cell activation. *J Immunol*. 1990;144:2524-8.
54. Pattison JM, Krensky AM. New insights into mechanisms of allograft rejection. *Am J Med Sci*. 1997;313:257-63.
55. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136:2348-57.
56. Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol*. 1994;6:757-64.
57. Watschinger B. How T cells recognize alloantigen: evidence for two pathways of allorecognition. *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10:1556-8.
58. Dallman MJ. Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Curr Opin Immunol*. 1995;7:632-8.
59. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994;76:241-51.
60. Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV. Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. *Science*. 1996;271:1728-30.
61. He XY, Chen J, Verma N, Plain K, Tran G, Hall BM. Treatment with interleukin-4 prolongs allogeneic neonatal heart graft survival by inducing T helper 2 responses. *Transplantation*. 1998;65:1145-52.

62. Shirwan H, Barwari L, Khan NS. 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*. 1998;66:1802-9.
63. Murphy B, Krensky AM. HLA-derived peptides as novel immunomodulatory therapeutics. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:1346-55.
64. Lee RS, Yamada K, Houser SL, Womer KL, Maloney ME, Rose HS, Sayegh MH, Madsen JC. Indirect recognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3276-81.
65. Renna-Molajoni E, Cinti P, Evangelista B, Orlandini AM, Molajoni J, Cocciolo PL, Suci-Foca N, Cortesini R. Role of the indirect recognition pathway in the development of chronic liver allograft rejection. *Transplant Proc*. 1998;30:2140-1.
66. Sawyer GJ, Dalchau R, Fabre JW. Indirect T cell allorecognition: a cyclosporin A resistant pathway for T cell help for antibody production to donor MHC antigens. *Transpl Immunol*. 1993;1:77-81.
67. Colovai AI, Molajoni ER, Cortesini R, Suci-Foca N. New approaches to specific immunomodulation in transplantation. *Int Rev Immunol*. 1996;13:161-72.
68. Gassel HJ, Greiner A, Eckstein V, Timmermann W, Gassel AM, Thiede A. Selective immunosuppression induces tolerance after liver transplantation: an immunohistochemical and cytofluorographic analysis of the graft and recipient immune system. *Transplant Proc*. 1997;29:1163.
69. Gasser M, Timmermann W, Vowinkel T, Tykal K, Hoppe H, Otto C, Gassel AM, Meyer D, Ulrichs K, Thiede A. Effect of selective immunosuppression with FK 506, anti-IL-2R, and anti- ICAM-1 MAb in rat small bowel transplantation. *Transplant Proc*. 1998;30:2605-6.
70. Krensky AM, Clayberger C. Immunologic tolerance: tailored antigen. *Transplant Proc*. 1996;28:2075-7.
71. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Proline isomerases at the crossroads of protein folding, signal transduction, and immunosuppression. *New Biol*. 1992;4:448-60.

72. Grcevic D, Batinic D, Ascensao JL, Marusic M. Pre-treatment of transplant bone marrow cells with hydrocortisone and cyclosporin A alleviates graft-versus-host reaction in a murine allogeneic host-donor combination. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23:1145-52.
73. Deltz. E. and Thiede, A. Microsurgical technique of small-intestine transplantation. In: Thiede, A, Deltz, E, Engemann, R. Hamelmann, H., Hrsg: *Microsurgical model in rats for transplantation research.* 1985; 51-55, Springer, Berlin. .
74. Timmermann W, Gasser M, Meyer D, Kellersmann R, Gassel HJ, Otto C, Thiede A. Progress in experimental intestinal transplantation in small animal models. *Acta Gastroenterol Belg.* 1999;62:216-20.
75. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, Turka LA. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med.* 1995;181:1869-74.
76. Otto C, Rohde AC, Timmermann W, Waaga AM, Gebert A, Gasser M, Gassel HJ, Thiede A, Ulrichs K. Acceptance of small bowel allografts by indirect allorecognition of donor class II MHC allopeptides. *Transplant Proc.* 2001;33:431-2.
77. Brenan M, Puklavec M. The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *J Exp Med.* 1992;175:1457-65.
78. Otto C, Ohrlein E, Meyer D, Timmermann W, Gassel HJ, Thiede A, Ulrichs K. Detection of dendritic cells with down-regulated CD80/CD86, but normal MHC class II expression after rat liver transplantation. *Transplant Proc.* 2001;33:442-4.
79. Gillespie KM, Saoudi A, Kuhn J, Whittle CJ, Druet P, Bellon B, Mathieson PW. Th1/Th2 cytokine gene expression after mercuric chloride in susceptible and resistant rat strains. *Eur J Immunol.* 1996;26:2388-92.
80. Rosemurgy AS, Schraut WH. Small bowel allografts. Sequence of histologic changes in acute and chronic rejection. *Am J Surg.* 1986;151:470-5.
81. Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P. T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N Engl J Med.* 1990;322:510-7.

82. Lechler RI, Batchelor JR. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med.* 1982;156:1835-41.
83. Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med.* 1982;155:31-41.
84. Watschinger B, Gallon L, Carpenter CB, Sayegh MH. 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.* 1994;57:572-6.
85. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:385-402.
86. Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation.* 1994;57:1295-302.
87. Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med.* 1992;175:305-8.
88. Fangmann J, Dalchau R, Sawyer GJ, Priestley CA, Fabre JW. T cell recognition of donor major histocompatibility complex class I peptides during allograft rejection. *Eur J Immunol.* 1992;22:1525-30.
89. Gallon L, Watschinger B, Murphy B, Akalin E, Sayegh MH, Carpenter CB. The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation.* 1995;59:612-6.
90. Bradley JA, Sarawar SR, Porteous C, Wood PJ, Card S, Ager A, Bolton EM, Bell EB. Allograft rejection in CD4+ T cell-reconstituted athymic nude rats--the nonessential role of host-derived CD8+ cells. *Transplantation.* 1992;53:477-82.
91. Bolton EM, Gracie JA, Briggs JD, Kampinga J, Bradley JA. Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *J Exp Med.* 1989;169:1931-46.

92. Rosloniec EF, Vitez LJ, Buus S, Freed JH. MHC class II-derived peptides can bind to class II molecules, including self molecules, and prevent antigen presentation. *J Exp Med.* 1990;171:1419-30.
93. Agrawal B, Manickasundari M, Fraga E, Singh B. T cells that recognize peptide sequences of self MHC class II molecules exist in syngeneic mice. *J Immunol.* 1991;147:383-90.
94. Liu Z, Sun YK, Xi YP, Harris P, Suci-Foca N. T cell recognition of self-human histocompatibility leukocyte antigens (HLA)-DR peptides in context of syngeneic HLA-DR molecules. *J Exp Med.* 1992;175:1663-8.
95. Liu Z, Braunstein NS, Suci-Foca N. T cell recognition of allopeptides in context of syngeneic MHC. *J Immunol.* 1992;148:35-40.
96. Rudensky A, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA, Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature.* 1991;353:622-7.
97. Shoskes DA, Wood KJ. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunology Today.* 1994;15:32-8.
98. Lombardi G, Lechler R. The molecular basis of allorecognition of major histocompatibility complex molecules by T lymphocytes. *Ann Ist Super Sanita.* 1991;27:7-14.
99. Batchelor JR, Welsh KI, Maynard A, Burgos H. Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke T-dependent alloimmunity. I. Retransplantation of (AS X AUG)F1 kidneys into secondary AS recipients. *J Exp Med.* 1979;150:455-64.
100. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med.* 1990;171:307-14.
101. Fangmann J, Dalchau R, Fabre JW. Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J Exp Med.* 1992;175:1521-9.
102. Auchincloss H, Jr., Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major

- histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3373-7.
103. Lee RS, Grusby MJ, Glimcher LH, Winn HJ, Auchincloss H, Jr. Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Exp Med*. 1994;179:865-72.
 104. Benham AM, Sawyer GJ, Fabre JW. Indirect T cell allorecognition of donor antigens contributes to the rejection of vascularized kidney allografts. *Transplantation*. 1995;59:1028-32.
 105. Dalloul AH, Chmouzis E, Ngo K, Fung-Leung WP. Adoptively transferred CD4+ lymphocytes from CD8 -/- mice are sufficient to mediate the rejection of MHC class II or class I disparate skin grafts. *J Immunol*. 1996;156:4114-9.
 106. Shirwan H, Leamer M, Wang HK, Makowka L, Cramer DV. Peptides derived from alpha-helices of allogeneic class I major histocompatibility complex antigens are potent inducers of CD4+ and CD8+ T cell and B cell responses after cardiac allograft rejection. *Transplantation*. 1995;59:401-10.
 107. Ghobrial R, Hamashima T, Kloc M, Etkin L, Stepkowski SM, Kahan BD. Membrane-bound or soluble truncated RT1.Aa rat class I major histocompatibility antigens induce specific alloimmunity. *Transplantation*. 1995;60:602-10.
 108. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB, Sayegh MH. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*. 1997;64:795-800.
 109. Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, Reed EF, Fisher PE, Mancini D, Rose EA, Cortesini R, Michler RE, Suci-Foca N. Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J Clin Invest*. 1996;98:1150-7.
 110. Braun MY, McCormack A, Webb G, Batchelor JR. Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization. *Transplantation*. 1993;55:177-82.

111. Benichou G, Takizawa PA, Ho PT, Killion CC, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE. Immunogenicity and tolerogenicity of self-major histocompatibility complex peptides. *J Exp Med.* 1990;172:1341-6.
112. Dalchau R, Fangmann J, Fabre JW. Allorecognition of isolated, denatured chains of class I and class II major histocompatibility complex molecules. Evidence for an important role for indirect allorecognition in transplantation. *Eur J Immunol.* 1992;22:669-77.
113. Parker KE, Dalchau R, Fowler VJ, Priestley CA, Carter CA, Fabre JW. Stimulation of CD4+ T lymphocytes by allogeneic MHC peptides presented on autologous antigen-presenting cells. Evidence of the indirect pathway of allorecognition in some strain combinations. *Transplantation.* 1992;53:918-24.
114. Schneck J, Munitz T, Coligan JE, Maloy WL, Margulies DH, Singer A. Inhibition of allorecognition by an H-2Kb-derived peptide is evidence for a T-cell binding region on a major histocompatibility complex molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:8516-20.
115. Clayberger C, Krensky AM. Immunosuppressive peptides corresponding to MHC class I sequences. *Curr Opin Immunol.* 1995;7:644-8.
116. Buelow R, Veyron P, Clayberger C, Pouletty P, Touraine JL. Prolongation of skin allograft survival in mice following administration of ALLOTRAP. *Transplantation.* 1995;59:455-60.
117. Murphy B, Kim KS, Buelow R, Sayegh MH, Hancock WW. Synthetic MHC class I peptide prolongs cardiac survival and attenuates transplant arteriosclerosis in the Lewis-->Fischer 344 model of chronic allograft rejection. *Transplantation.* 1997;64:14-9.
118. Gao L, Woo J, Buelow R. Both L- and D-isomers of allotrap 2702 prolong cardiac allograft survival in mice. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15:78-87.
119. Giral M, Cuturi MC, Nguyen JM, Josien R, Dantal J, Floc'h R, Buelow R, Pouletty P, Soulillou JP. Decreased cytotoxic activity of natural killer cells in kidney allograft recipients treated with human HLA-derived peptide. *Transplantation.* 1997;63:1004-11.
120. Vella JP, Magee C, Vos L, Womer K, Rennke H, Carpenter CB, Hancock W, Sayegh MH. Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft

- rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation*. 1999;67:1523-32.
121. Charlton B, Auchincloss H, Jr., Fathman CG. Mechanisms of transplantation tolerance. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:707-34.
 122. Schwartz. *immunological Tolerance*. New York: Raven Press; 1993.
 123. Abbas AK LA, Pober JS. Self-tolerance and autoimmunity. *Cellular and Molecular Immunology*. 1997;407-422.
 124. Dallman MJ, Shiho O, Page TH, Wood KJ, Morris PJ. Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway. *J Exp Med*. 1991;173:79-87.
 125. Sayegh MH, Perico N, Imberti O, Hancock WW, Carpenter CB, Remuzzi G. Thymic recognition of class II major histocompatibility complex allopeptides induces donor-specific unresponsiveness to renal allografts. *Transplantation*. 1993;56:461-5.
 126. Remuzzi G, Noris M, Benigni A, Imberti O, Sayegh MH, Perico N. Thromboxane A2 receptor blocking abrogates donor-specific unresponsiveness to renal allografts induced by thymic recognition of major histocompatibility allopeptides. *J Exp Med*. 1994;180:1967-72.
 127. Sayegh MH, Perico N, Gallon L, Imberti O, Hancock WW, Remuzzi G, Carpenter CB. Mechanisms of acquired thymic unresponsiveness to renal allografts. Thymic recognition of immunodominant allo-MHC peptides induces peripheral T cell anergy. *Transplantation*. 1994;58:125-32.
 128. Hancock WW, Khoury SJ, Carpenter CB, Sayegh MH. 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. *Am J Pathol*. 1994;144:1149-58.
 129. Sayegh MH, Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL, Carpenter CB. Induction of immunity and oral tolerance with polymorphic class II major histocompatibility complex allopeptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:7762-6.
 130. Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully

- mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods*. 1999;223:1-15.
131. Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, al-Sabbagh A, Santos L, Sayegh M, Nussenblatt RB, Trentham DE, Hafler DA. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:809-37.
 132. Lechler R, Bluestone JA. Transplantation tolerance--putting the pieces together. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:631-3.
 133. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med*. 1992;176:1355-64.
 134. Chen N, Field EH. Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation*. 1995;59:933-41.
 135. Chen N, Gao Q, Field EH. Expansion of memory Th2 cells over Th1 cells in neonatal primed mice. *Transplantation*. 1995;60:1187-93.
 136. Chen N, Gao Q, Field EH. Prevention of Th1 response is critical for tolerance. *Transplantation*. 1996;61:1076-83.
 137. Powell TJ, Jr., Streilein JW. Neonatal tolerance induction by class II alloantigens activates IL-4-secreting, tolerogen-responsive T cells. *J Immunol*. 1990;144:854-9.
 138. Hancock WW, Sayegh MH, Kwok CA, Weiner HL, Carpenter CB. Oral, but not intravenous, alloantigen prevents accelerated allograft rejection by selective intragraft Th2 cell activation. *Transplantation*. 1993;55:1112-8.
 139. Piccotti JR, Chan SY, Goodman RE, Magram J, Eichwald EJ, Bishop DK. IL-12 antagonism induces T helper 2 responses, yet exacerbates cardiac allograft rejection. Evidence against a dominant protective role for T helper 2 cytokines in alloimmunity. *J Immunol*. 1996;157:1951-7.

140. VanBuskirk AM, Wakely ME, Orosz CG. Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection. *Transplantation*. 1996;62:229-38.
141. Fukuzawa M, Sharrow SO, Shearer GM. Effect of cyclosporin A on T cell immunity. II. Defective thymic education of CD4 T helper cell function in cyclosporin A-treated mice. *Eur J Immunol*. 1989;19:1147-52.
142. Chen W, Murphy B, Waaga AM, Willett TA, Russell ME, Khoury SJ, Sayegh MH. Mechanisms of indirect allorecognition in graft rejection: class II MHC allopeptide-specific T cell clones transfer delayed-type hypersensitivity responses in vivo. *Transplantation*. 1996;62:705-10.
143. Steele DJ, Laufer TM, Smiley ST, Ando Y, Grusby MJ, Glimcher LH, Auchincloss H, Jr. Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med*. 1996;183:699-703.
144. Waaga AM, Gasser M, Kist-van Holthe JE, Najafian N, Muller A, Vella JP, Womer KL, Chandraker A, Khoury SJ, Sayegh MH. Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopeptide-specific Th2 clones in vivo. *J Clin Invest*. 2001;107:909-16.
145. Waaga AM, Chandraker A, Spadafora-Ferreira M, Iyengar AR, Khoury SJ, Carpenter CB, Sayegh MH. Mechanisms of indirect allorecognition: characterization of MHC class II allopeptide-specific T helper cell clones from animals undergoing acute allograft rejection. *Transplantation*. 1998;65:876-83.
146. Lenhard SM, Gasser M, Otto C, Kist-van Holthe JE, Navarro E, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A, Waaga AM. Influence of class II MHC-specific allopeptides via the indirect pathway of allorecognition in experimental small bowel and kidney transplantation. *Graft*. 2002;5(3):182-186.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| Abb. | Abbildung(en) |
| Ak | Antikörper |
| BN | Brown Norway (Rattenstamm) |
| Con A | Concanavalin A |
| cpm | counts per minute |
| CsA | Cyclosporin A (Sandimmun ®) |
| DC | dendritische Zelle |
| DD | Dünndarm |
| DDTx | Dünndarmtransplantation |
| DTH | Delayed Type Hypersensitivity (Verzögerte zelluläre Typ-IV-Reaktion) |
| ELISA | Enzyme Linked-immunosorbent Assay |
| FACscan | Fluorescence Activated Cell Scanner (Durchflußzytometer) |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| FITC | Fluoreszein-Isothiocyanat |
| FK 506 | Tacrolimus (Prograf ®) |
| FSC | Forward- Scatter |
| HG | housekeeping gene |
| HLA | Human Leukocyte Antigen (Haupthistokompatibilitätskomplex beim Menschen) |
| i.p. | intraperitoneal |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| KG | Körpergewicht |
| LEW | Lewis (Rattenstamm) |
| mAB | monoklonal antibody (monoklonaler Antikörper) |
| MHC | Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex) |
| MLR | Mixed Lymphocyte Reaction, Gemischte Lymphozyten Reaktion |

| | |
|-----------|---|
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen (Natural Killer Cells) |
| NTx | Nierentransplantation |
| OP | Operation |
| PBS | Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) |
| PE | Phykoerythrin |
| p.op. | post operationem |
| RNA | ribonucleinacid (Ribonukleinsäure) |
| SSC | Sideward-Scatter |
| Tab. | Tabelle(n) |
| TCR | T-cell receptor (T-Zell-Rezeptor) |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TPN | Total Parenteral Nutrition |
| Tx | Transplantation |
| WF | Wistar Furth (Rattenstamm) |

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. A. Thiede, dem Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg, danke ich dafür, dass er mir die Durchführung des experimentellen Teiles dieser Arbeit ermöglichte.

Für die Überlassung des Themas, die hilfreiche Anleitung zur selbstständigen wissenschaftlichen Tätigkeit und Ausarbeitung dieser Arbeit gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. W. Timmermann.

Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Transplantationsimmunologie der Chirurgischen Universitätsklinik in Würzburg, möchte ich herzlich für die hilfreiche Unterstützung bei der Kontaktaufnahme mit dem Labor für Transplantation und Immunogenetik in Boston sowie für ihr reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. rer. nat. C. Otto, Mitarbeiter der experimentellen Transplantations-Immunologie, danke ich besonders für die Hilfe und Betreuung beim experimentellen Arbeiten im Labor, seine Unterstützung bei der Versuchskonzeption, die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen guten Anregungen bei der schriftlichen Ausfertigung.

Frau Prof. Dr. rer. nat. A.M. Waaga-Gasser danke ich ganz besonders für die gute Betreuung während meiner Tätigkeit im Partner-Labor in Boston und für die sich daran anschließende intensive Diskussion meiner Ergebnisse, welche maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. med. M. Gasser möchte ich herzlich für die gute Zusammenarbeit in Boston, die Operation der Versuchstiere und die stete Bereitschaft zur Diskussion meiner Ergebnisse danken.

Für die Operation zahlreicher Versuchstiere gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. E. Navarro, DAAD-Stipendiat aus Guadalajara, Mexiko, sowie den Mitarbeiterinnen des transplantations-immunologischen Labors, Frau A. Gebert und Frau J. Grimmer. Frau J. Grimmer und Frau N. Kehl führten dankenswerterweise die histologischen Färbungen durch. Frau N. Martens danke ich sehr für die Hilfe im tierexperimentellen Labor.

Allen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden möchte ich herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit und die interessanten Vorträge bei den Doktorandenseminaren danken.

Ebenso danke ich Frau M. Baumgartl-Schlotter und Herrn H. Bergauer für die Mithilfe bei der Anfertigung von Photographien.

Curriculum Vitae

Name Susanne Miriam Lenhard
Geburt 25. September 1976, Dortmund
Familienstand ledig
Eltern Priv.-Doz. Dr. phil. Albin Lenhard,
OSTR´ Ulrike Lenhard-Höffe

Bildung

1983-1987 Albert-Schweitzer-Grundschule, Schwerte
09/1991-11/1991 Hillcrest School, Hastings, Großbritannien
1987-1996 Städtisches-Ruhrtal-Gymnasium, Schwerte,
1996 Abitur
seit 10/1996 Medizinstudium, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
10/1998 Physikum
10/1999 Erstes Staatsexamen
03/2002 Zweites Staatsexamen
2001-2002 Intensivstudium Betriebswirtschaftslehre für Ärzte
07/2002 Diplom in Gesundheitsökonomie
05/2003 Drittes Staatsexamen

Klinische Ausbildung

03/1997 Orthopädie, Poole Hospital, Poole, Großbritannien
04/1999 Chirurgie, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
09/1999-10/1999 Kinderorthopädie, Hospital for Special Surgery, New York,
USA
04/2002-08/2002 Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsspital Zürich,
Schweiz
08/2002-12/2002 Innere Medizin, Brigham and Women´s Hospital,
Harvard Medical School, Boston, USA
12/2002-02/2003 Allgemeinchirurgie, Chirurgische Universitätsklinik Würzburg
02/2003-04/2003 Plastische Chirurgie, Chirurgische Universitätsklinik Würzburg

Forschung

- 09/1998-2001 Doktorarbeit:
Untersuchung der immunbiologischen Effekte synthetischer
MHC-Klasse-II-Peptide nach experimenteller Nieren- oder
Dünndarmtransplantation
Labor für mikrochirurgische Transplantations-Immunologie,
Klinik für Chirurgie, Universität Würzburg
- 08/2000-12/2000 Forschungsprojekte am Labor für Immunogenetics und
Transplantation am Brigham and Women´s Hospital, Boston
und Children´s Hospital, Boston, USA
- 11/2001 Preis der Deutschen Transplantationsgesellschaft 2001,
Heidelberg

Sprachen

Deutsch, Englisch, Französisch, Spanisch, Latein