

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Chirurgische Klinik I

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

**Mechanismen immunologischer Toleranz nach  
Lebertransplantation:  
Untersuchungen zum Zytokinmuster intrahepatischer  
CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>neg</sup>  
T-Lymphozyten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**Paul Schmitz**

aus Regensburg

Würzburg, Juni 2007

Referent: Privatdozent Dr. rer. nat. C. Otto  
Korreferent: Prof. Dr. med. A. Thiede  
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2007**

**Der Promovend ist Arzt**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>9</b>
3.1	Versuchstiere und Transplantationsmodelle.....	9
3.2	Mikrochirurgische Operationstechniken.....	10
3.3	Isolierung intraorganischer Leukozyten .....	13
3.4	Durchflusszytometrische Untersuchungen .....	14
3.5	Stimulation isolierter Leukozyten.....	19
3.6	Bestimmung des Zytokinmusters .....	20
3.7	Statistische Auswertung .....	23
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>24</b>
4.1	Die Immunantwort nach Lebertransplantation .....	24
4.2	Zytokinmuster der CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten.....	26
4.3	Phänotypisierung von Leber- und Milzleukozyten .....	31
<b>5</b>	<b>Beantwortung der Fragen</b> .....	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>45</b>
6.1	Zelluläre Prozesse nach Lebertransplantation.....	46
6.2	Naive, aktivierte und Gedächtnis T- Lymphozyten .....	47
6.3	Funktionelle Differenzierung intrahepatischer CD4 <sup>+</sup> CD45RC T-Lymphozyten .....	51
<b>7</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>56</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>61</b>

## 1 Einleitung

Die klinische Organtransplantation hat sich weltweit zu einem erfolgreichen Therapieverfahren für irreversibel geschädigte Organe entwickelt ([www.eurotransplant.nl](http://www.eurotransplant.nl)). Die Ära der modernen Transplantationsmedizin begann im Dezember 1954, als es Murray und seinem Team gelang, die erste erfolgreiche Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingen durchzuführen (Murray JE et al., 1955; 1963). Ebenfalls war es Murray, der zeigen konnte, dass die für die irreversible Transplantatzerstörung verantwortliche Immunbarriere zwischen genetisch nicht identischen Personen - und dies ist klinisch die Regel - therapeutisch zu überwinden ist (Merrill JP, 1960). Die Einführung so genannter Immunsuppressiva hat ohne Zweifel wesentlich zum Erfolg der Transplantationsmedizin in den letzten Jahrzehnten beigetragen. So werden heute lebenswichtige Organe wie Herz, Lunge, Leber, Niere und Pankreas in zahlreichen Zentren der Welt überaus erfolgreich transplantiert.

Die Ursache der Transplantatabstoßung ist bekannt: sämtliche Zellen von Organspender und Organempfänger unterscheiden sich – wenn es sich nicht um Zwillingspaare handelt – in ihren Zelloberflächenstrukturen. Bereits geringe genetisch bedingte Unterschiede in diesen Strukturen reichen aus, um das Immunsystem des Organempfängers zu aktivieren. Die für die Transplantationsmedizin wichtigste Gruppe von Oberflächenstrukturen wird von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes („major histocompatibility complex“ oder MHC) kodiert. Die Bedeutung dieser MHC-Moleküle für die Transplantatabstoßung ist so grundlegend, dass sie auch als Transplantationsantigene oder Alloantigene bezeichnet werden. Doch auch bei vollständiger Übereinstimmung von Spender und Empfänger in den MHC-Molekülen entwickelt sich mit der Zeit eine Immunantwort. In standardisierten Tierexperimenten wurde eine solche späte Abstoßung eindeutig nachgewiesen. Ursache hierfür sind Unterschiede in Oberflächenstrukturen, die nicht vom MHC kodiert werden und

deshalb auch als minor MHC bezeichnet werden. Diese Unterschiede kommen aber nur bei Übereinstimmung in den MHC-Molekülen zum Tragen.

MHC-Moleküle sind auf allen Zellen des Organtransplantates wie Parenchym- und Endothelzellen zu finden, ebenso auf den so genannten „passenger leukocytes“. Hierbei handelt es sich um Leukozyten, die sich im Organ befinden und mit der Transplantation in den Empfänger gelangen. Dort werden sie vom Immunsystem als fremd erkannt und lösen eine das Transplantat zerstörende Immunantwort aus. Beginnend mit der Aktivierung alloreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten werden Effektorzellen, wie CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten rekrutiert, die das fremde Organ attackieren und somit zum Funktionsverlust beitragen (Medawar PB, 1944; Lechler RI, 1982). Die Transplantatabstoßung kann akut innerhalb weniger Tage nach Transplantation auftreten, sich aber auch chronisch über Monate bis Jahre entwickeln. Entsprechend wird von akuter oder chronischer Abstoßung gesprochen (Abb. 1.1).

Die Entdeckung, dass Zytostatika die zur Transplantatabstoßung führende (allogene) Immunantwort hemmen (Schwartz RS, 1959), eröffnete Perspektiven zur gezielten Suche nach spezifischen Immunsuppressiva (Denton MD, 1999). So revolutionierte die Einführung von Cyclosporin A, welches als Calcineurin-Inhibitor in der frühen Phase der T-Zellaktivierung wirksam wird, die Transplantationsmedizin in bisher nicht gekannter Weise. Mit Cyclosporin A wurden die Überlebensraten nach Nierentransplantation auf nahezu 80 Prozent im ersten Jahr gesteigert. Ein wesentliches Problem sämtlicher in der Klinik eingesetzter Immunsuppressiva ist jedoch, dass sie zur Hemmung der Transplantatabstoßung die gesamte Immunabwehr beeinträchtigen. Hierdurch begünstigen sie die Entstehung von Infektionen und Tumorerkrankungen (Opelz G, 1993; Fishman JA, 1998). Zurzeit gibt es jedoch keine Alternative zur immunsuppressiven Therapie.

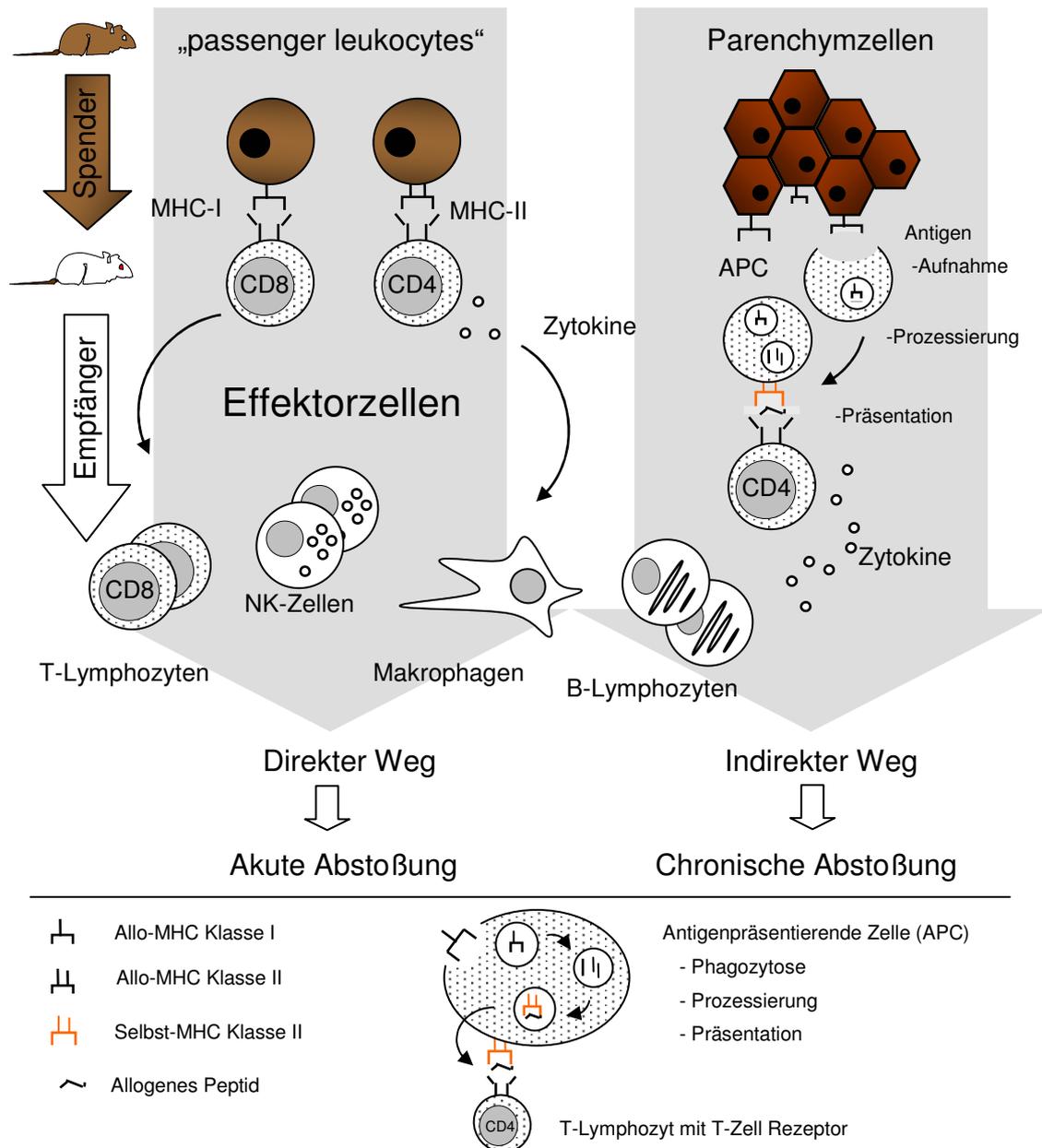


Abb. 1.1: Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten nach Lebertransplantation: Alloreaktive  $CD8^+$  T-Lymphozyten des Empfängers erkennen allogene MHC Klasse-I Moleküle auf der Oberfläche von Spenderzellen und werden zu Effektorzellen aktiviert. Alloreaktive  $CD4^+$  T-Lymphozyten erkennen allogene MHC Klasse-II Moleküle der Spenderzellen und werden ebenfalls aktiviert. Sie sezernieren Zytokine und rekrutieren Effektorzellen (NK-Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten). Die Fähigkeit alloreaktiver T-Lymphozyten allogene MHC-Moleküle zu erkennen, wird als direkter Weg der Alloantigenerkennung bezeichnet; dieser führt zur akuten Transplantatabstoßung. Antigenpräsentierende Zellen (APC) des Empfängers können allogene MHC-Moleküle (sowohl MHC Klasse-I als auch Klasse-II) aufnehmen, sie zu Peptiden prozessieren und sie anschließend in eigenen MHC Klasse-II Molekülen den  $CD4^+$  T-Lymphozyten präsentieren. Über solche empfangereigenen antigenpräsentierenden Zellen wird der „indirekte Weg der Alloantigenerkennung“ ausgelöst, der maßgeblich für die chronische Abstoßung verantwortlich ist.

Sir Roy Calne entdeckte 1969 das Phänomen der Lebertransplantat-Spontantoleranz. Hierzu führte er Lebertransplantationen bei Schweinen durch, die sich sowohl in ihren MHC Klasse-I als auch MHC Klasse-II Molekülen unterschieden. Dabei beobachtete er, dass einige der Empfängertiere das Transplantat auch ohne Immunsuppression langfristig tolerierten (Calne RY, 1969).

Weiterführende Untersuchungen in Ratte und Maus zeigten, dass die Ausprägung der Immunantwort in Richtung Abstoßung oder Toleranz von der Spender-Empfänger-Kombination abhängt (Kamada N, 1985; Zimmermann FA, 1984). Dabei ist nicht nur die genetische Differenz zwischen Spender und Empfänger von Bedeutung, sondern interessanterweise auch die Transplantationsrichtung, d.h. welcher Inzuchtstamm als Spender und welcher als Empfänger verwendet wird. So werden allogene Lebertransplantate aus Ratten des Inzuchtstammes Dark Agouti von Ratten des Inzuchtstammes Lewis akut abgestoßen. Hingegen tolerieren Dark Agouti Empfänger Lebertransplantate von Lewis Ratten spontan ohne immunsuppressive Therapie (Abb. 1.2). Zahlreiche Arbeitsgruppen haben sich mit den immunologischen Ursachen der Lebertransplantat-Spontantoleranz beschäftigt. Sämtliche Studien zur anatomischen und immunphysiologischen Besonderheit der Leber, sowie zu verschiedensten immunologischen Vorgängen nach Lebertransplantation in den zentralen und peripheren lymphatischen Geweben konnten bisher dieses Phänomen nicht umfassend erklären.

### Orthotope Lebertransplantation

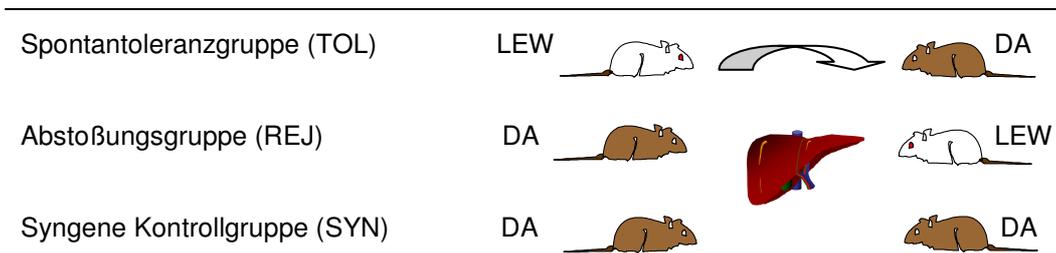


Abb. 1.2: Die orthotope Transplantation allogener Lebern in der Rattenstamm-Kombination LEW-nach-DA führt zur Spontantoleranz der Lebertransplantate (Spontantoleranzgruppe), wohingegen die reziproke Transplantation DA-nach-LEW in eine akute Abstoßung führt (Abstoßungsgruppe). Als Kontrollgruppe wurde die syngene Transplantation DA-nach-DA durchgeführt. Untersuchungen wurden an den Tagen 3, 30 und 100 nach Transplantation, sowie an nicht-transplantierten DA-Ratten durchgeführt. Pro Gruppe und Versuchstag wurden jeweils mindestens drei Analysen vorgenommen.

Zwar sind – wie in Abb. 1.1 gezeigt – alloreaktive  $CD4^+$  T-Lymphozyten maßgeblich an der Auslösung der Transplantatabstoßung beteiligt, doch gibt es auch T-Lymphozyten, die an der Ausbildung von Toleranz involviert sind. Diese so genannten tolerogenen T-Lymphozyten, die sich über ihre Funktion, nämlich Hemmung einer Immunantwort, definieren lassen, konnten jedoch nie eindeutig phänotypisch charakterisiert werden. Erst im Jahre 1995 gelang es Sakaguchi et al. tolerogene T-Lymphozyten „greifbar“ zu machen. Sie identifizierten einen Subtyp von CD25-positiven ( $CD25^{pos}$ ) T-Lymphozyten, der *in vitro* die Funktion von T-Helfer Zellen (Th1- und Th2 Zellen) hemmt und Immunantworten *in vivo* blockiert (Sakaguchi et al., 1995; Groux H et al., 1997). Dabei scheinen nicht nur  $CD4^+$  T-Lymphozyten über regulatorische Eigenschaften zu verfügen, sondern auch andere Zellen wie  $CD8^+$  T-Lymphozyten (Hutchinson IV, 1986; Gilliet M, 2002; Yhou J, 2001)  $TCR^+CD4^{neg}CD8^{neg}$  T-Lymphozyten (Zhang Z et al., 2000) und Natürliche Killerzellen (Zeng D et al., 1999; Seino KI, et al., 2001).

Der Wirkmechanismus regulatorischer T-Lymphozyten, die auch für die Transplantationsforschung von großer Bedeutung sind (Wells A, 2001; Wood

KJ, 2001), ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Zum einen werden Zytokine wie IL-10 (Hoffmann P, 2002; Hara M et al., 2001; Kingsley CI, 2002) und TGF- $\beta$  (Josien R et al., 1998; Bickerstaff AA, 2000) als Vermittler der regulatorischen Effekte postuliert. Zum anderen scheint ein direkter Kontakt zwischen regulatorischen T-Lymphozyten und den Ziel T-Lymphozyten notwendig zu sein. Hierfür wurden bisher als relevante Moleküle CTLA-4 und CD28 beschrieben (Takahashi T et al., 2000; Read S, 2000; Salomon B, 2001).

Ein wesentliches Problem bei Arbeiten mit regulatorischen T-Lymphozyten ist, dass auch weiterhin geeignete Marker zu ihrer eindeutigen Identifizierung fehlen. Dabei ist unbestritten, dass der Großteil der regulatorischen T-Lymphozyten den Phänotyp aktivierter Zellen aufweist. Es handelt sich somit bei ihnen um CD25<sup>pos</sup> und CD45R-negative (CD45R<sup>neg</sup>) T-Lymphozyten. Aktivierte T-Lymphozyten sezernieren nicht nur bestimmte Zytokine, sie zeigen auch Veränderungen in der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, die mit ihrer Funktion korreliert (Powrie F, Mason D, 1990a und 1989; Spickett GP et al., 1983). So wurden von der japanischen Arbeitsgruppe um Ogawa in tolerierten Lebertransplantaten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nachgewiesen, die eine Isoform von CD45R exprimierten (Miyanari N et al., 1997). Dieser Rezeptor wird allgemein als „leukocyte common antigen“ bezeichnet (Powrie F, Mason D, 1990b). Die Isoformen werden durch alternatives „splicing“ der mRNA hergestellt. Sich nicht-teilende („resting“) T-Lymphozyten der Ratte, zu denen neben naiven T-Lymphozyten auch Gedächtniszellen zählen, exprimieren die CD45RC Isoform. Sie werden deshalb auch als CD45RC<sup>pos</sup> bezeichnet. Aktivierte T-Lymphozyten der Ratte hingegen exprimieren kein CD45RC und werden als CD45RC<sup>neg</sup> bezeichnet (Sarawar SR et al., 1993; Swain SL et al., 1993).

Auch nach Lebertransplantation lassen sich zumindest in der Toleranzsituation regulatorisch wirksame T-Lymphozyten funktionell nachweisen (Gassel HJ, 1992). Während einige Gruppen diese Zellen in den peripheren lymphatischen Organen suchen, gibt es Hinweise, dass sie sich auch im Transplantat selbst

befinden (Miyanari N et al., 1997). Mit dem Konzept, dass regulatorische T-Lymphozyten die Immuntoleranz aufrechterhalten, ließe sich die vielfach beschriebene Präsenz aktivierter T-Lymphozyten auch in der Phase stabiler Toleranz elegant erklären. Es wäre somit nicht mehr notwendig zu postulieren, dass zur Ausbildung von Toleranz sämtliche alloreaktiven T-Lymphozyten in einer klonalen Deletion oder klonalen Erschöpfung eliminiert werden, vergleichbar mit den Vorgängen im Thymus zur Erhaltung der zentralen Toleranz, sondern ihre Aktivierung ist lediglich von regulatorischen T-Lymphozyten zu kontrollieren.

Ziel dieser Arbeit war, das Phänomen der Lebertransplantat-Spontantoleranz in dem in Abb. 1.2 beschriebenen Tiermodell LEW-nach-DA zu untersuchen. Insbesondere sollte nach einer Population von T-Lymphozyten gesucht werden, die an der Ausbildung von Spontantoleranz beteiligt ist. Dabei stellte sich nicht nur die Frage, in wie weit diese Zellen für die Ausbildung der Spontantoleranz verantwortlich sind, sondern auch, ob sie sich als „immunologische Indikatoren“ eignen, um stabile Toleranz anzuzeigen.

## 2 Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigte sich mit dem Phänomen der Lebertransplantat-Spontantoleranz. Hierzu wurde der Phänotyp aus Lebertransplantaten isolierter Leukozyten sowie das Zytokinprofil intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten untersucht. Die Beantwortung folgender Fragen stand dabei im Mittelpunkt.

1. Unterscheiden sich intrahepatische Leukozyten und Milz-Leukozyten hinsichtlich ihres Phänotyps? Lassen sich qualitative und quantitative Unterschiede feststellen?
2. Welche Zytokine werden von aufgereinigten CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> sezerniert und welche von CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten?
3. Lässt sich durch die kombinierte Analyse von Oberflächenmolekülen und Zytokinen eine Population von T-Lymphozyten mit immunmodulatorischer Funktion identifizieren?
4. Unterscheiden sich *in vivo* aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten von *in vitro* stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere und Transplantationsmodelle

#### *Versuchstiere*

Für die Experimente wurden 220-270 g schwere männliche Ratten kontrollierter Inzuchtstämme eingesetzt (Charles River, Sulzfeld und Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland). Zum Schutz vor opportunistischen Infektionen, wurden die Tiere in keimarmen Klimaschränken (Scantainer<sup>®</sup>, Fa. Scanbur, Køgen, Dänemark) in Makrolon<sup>®</sup>-Käfigen gehalten. Die Tiere erhielten jeden zweiten Tag frisches Einstreu und Zellstoffunterlagen, sowie Wasser und Altromin<sup>®</sup>-Pressfutter ad libidum. Folgende Inzuchtstämme wurden verwendet:

**Lewis (LEW):** MHC Haplotyp RT1<sup>l</sup>, Spender von Leber- und Herztransplantaten.

**Wistar Furth (WF):** MHC Haplotyp RT1<sup>u</sup>, Spender von Herztransplantaten.

**Dark Agouti (DA):** MHC Haplotyp RT1<sup>avl</sup>, Organempfänger und Kontrollgruppe.

#### *Transplantationsmodelle*

Die orthotope Lebertransplantation wurde in zwei Versuchsgruppen durchgeführt. In der allogenen Stammkombination LEW-nach-DA erhielten DA-Ratten ein MHC-differentes (allogenes) Lebertransplantat von LEW-Spendern. Die Transplantate wurden spontan, d.h. ohne immunsuppressive Therapie, vom Empfänger langfristig akzeptiert (u.a. Frages O et al., 1994). Da diese Langzeitakzeptanz auf immunologischer Toleranz beruht, wurde diese Versuchsgruppe als Spontantoleranzgruppe (TOL) bezeichnet. Als Kontrollgruppe (SYN) wurden syngen transplantierte DA Lebern untersucht (Abb. 1.2).

## 3.2 Mikrochirurgische Operationstechniken

Zur Organtransplantation wurden die Ratten mit Isofluran<sup>®</sup> anästhesiert. Der Bauch der Ratte wurde rasiert und mit Kodan-Spray<sup>®</sup> desinfiziert. Über eine mediane Laparotomie erfolgte der Zugang zum Bauchsitus. Die Präparation der Organe und die Anastomosierung der Gefäße wurden mit einem Operationsmikroskop bei 10-25facher Vergrößerung (Fa. Codman, Herbruggen, Schweiz) durchgeführt. Die Gefäßanastomosen wurden mit monofilen, nicht-resorbierbaren Fäden der Stärken 6-0 bis 9-0 (Prolene<sup>®</sup>, Ethilon) in Standardnahttechnik erstellt. Zur Schienung der Gallenganganastomose wurde ein Polyethylen-Splint (22G Braunüle, Fa. Braun, Melsungen) verwendet, der mit einer 6-0 Seidenligatur (NC-Seide, Fa. Braun) im Gallengang fixiert wurde. Der Bauchdeckenverschluss erfolgte in zweischichtiger Einzelknopfnahntechnik mit 4-0 Prolene<sup>®</sup>.

### 3.2.1 Orthotope Lebertransplantation

Die orthotope Transplantation der Rattenlebern wurde nach einer von Engemann modifizierten Technik mit Reanastomosierung der Arteria hepatica durchgeführt (Gassel HJ, 1998).

#### *Leberexplantation*

Nach Eröffnen des Bauchsitus wurde die Leber von ihren Haltebändern befreit. Anschließend wurden folgende Gefäße nacheinander ligiert und durchtrennt: Vena phrenica sinistra, Arteria und Vena suprarenalis dextra, Vena pylorica und Vena splenica. Dann wurde der Ductus choledochus präpariert und in diesen einen Polyethylen-Splint eingebracht. Anschließend wurde die Arteria abdominalis bis zur Bifurkation mobilisiert. Sie wurde später beim Einbau des Transplantats als Verlängerung der Arteria hepatica propria genutzt, was die Anastomosierung mit der Aorta des Empfängers vereinfachte. Der Truncus coeliacus wurde nun präpariert, wobei die Aa. lienalis und gastrica sinistra mit Ligaturen versehen und durchtrennt wurden. Die Hepatektomie erfolgte nach Ausklemmung des Ductus choledochus, sowie der Vena porta und der Venae

cava infra- und supra-hepatica. Abschließend wurde die Spenderleber über die Vena porta und Arteria abdominalis mit 4°C kalter, physiologischer Kochsalzlösung perfundiert.

#### *Lebertransplantation*

Zur Transplantation der Spenderleber wurden der Reihe nach die sich entsprechenden Gefäße End-zu-End anastomosiert. Begonnen wurde mit der Vena cava inferioris suprahepatica, gefolgt von der Anastomosierung der Vena porta. Danach wurden die entsprechenden Klemmen geöffnet. Dies entlastete den Pfortaderkreislauf und beendete die anhepatische Phase von 15-20 Min. Nun wurden die V. cava inferioris infrahepatica anastomosiert und das Aortensegment, welches die Arteria hepatica propria der Spenderleber verlängerte an die Aorta des Empfängers infrarenal End-zu-Seit angeschlossen. Beendet wurde der Lebereinbau durch das Einführen und Fixieren des Gallengangsplits in den Empfänger-Gallengang. Die Operationsdauer betrug bei Spender und Empfänger jeweils 50 bis 60 Min, die kalte Ischämiezeit insgesamt hingegen nur 50 bis 80 Min. Operierte Tiere, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Operation verstarben (< 3 Prozent) wurden auf technisches Versagen zurückgeführt.

#### *Obduktion der Tiere und Organgewinnung*

Den in tiefer Narkose befindlichen Tieren wurde zur Organentnahme das Abdomen durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Das Lebertransplantat wurde nach Größe, Farbe, Konsistenz, sowie der Beschaffenheit des Leberrandes beurteilt. Die Anastomosen des Transplantates wurden sorgfältig präpariert und auf Durchgängigkeit untersucht. Bei der Organentnahme wurde als erstes die Milz entnommen. Hierzu wurden die Arteria und Vena lienalis ligiert und durchtrennt. Dann wurde die Arteria hepatica und die Pfortader ligiert. Nach Eröffnung der Vena cava inferior wurde die Leber über die Pfortader mit 10 ml 4°C kalter NaCl-Lösung perfundiert. Hierdurch wurden die intravasalen Zellen ausgeschwemmt, so dass für die anschließenden Analysen nur organständige Leukozyten verwendet wurden. Nach Absetzen der restlichen

Anastomosen wurde die Leber explantiert und in Kulturmedium RPMI 1640 mit Zusätzen aufbewahrt.

- ◆ RPMI 1640 plus Zusätze: 20 mmol/L HEPES, 2 mmol/L L-Glutamin, 50 µmol/L 2-Mercaptoethanol, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin (GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 10 Prozent inaktiviertes fetales Kälberserum (Cell Concepts, Umkrich, Deutschland).

### **3.2.2 Heterotope Herztransplantation**

Die heterotope Herztransplantation wurde in fünf verschiedenen Versuchsgruppen (Tab. 4.1) nach der von Ono und Lindsey 1969 beschriebenen Technik durchgeführt. Hierzu wurden die Vena cava inferior und superior sowie die Venae pulmonales ligiert und abgesetzt. Nach Durchtrennung der Aorta ascendens und des Truncus pulmonalis wurde das Herz entnommen und bis zur Implantation in 4°C kalter NaCl-Lösung aufbewahrt. Die beim Empfänger infrarenal freipräparierte Aorta abdominalis und die Vena cava inferior wurde an die Aorta ascendens bzw. Truncus pulmonalis des Spenderherzens End-zu-Seit anastomosiert. Hierbei wurde ein retrograder Blutstrom durch die Aorta in die Koronargefäße, von dort in den rechten Vorhof und weiter über die rechte Herzkammer in den Truncus pulmonalis und die Empfängervene erreicht. Mit Einsetzen der Perfusion kam es spontan zur Funktionsaufnahme des Transplantats. Nach Verschluss der Bauchdecke konnte die Herzaktion perkutan ertastet werden. Die Funktionsdauer der Transplantate entsprach dem Zeitraum, in dem eine kräftige Kontraktion des Herzens gut tastbar war.

### 3.3 Isolierung intraorganischer Leukozyten

#### 3.3.1 Isolierung intrahepatischer Leukozyten

Zur Gewinnung der intrahepatischen Leukozyten wurde die von Wack et al. 1997 beschriebene Methode modifiziert. Die explantierten Lebern wurden mit einem Skalpell in etwa 1 cm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten, die durch ein feines Sieb (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) passiert wurden. Der Gewebebrei wurde in PBS (siehe unten) aufgenommen und für 7 Min bei 580 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen und Gewebetrümmer wurden in 40 ml PBS aufgenommen. Dem Puffer wurde Kollagenase Typ IV (Sigma) in einer Endkonzentration von 100 U/ml sowie 0,001 Prozent (Endkonzentration) DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) beigesetzt. In dieser Lösung wurden Zellen und Gewebetrümmer für 30 Min im Schüttelwasserbad inkubiert (37°C und 80 Runden/Min). Zum Abtrennen der groben Bestandteile wurde die Suspension für 2 Min mit 16 x g ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand über doppelt gelegter Gaze mit einer Porengröße von 100 µm (Hartenstein, Würzburg, Deutschland) filtriert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert und die mit 40 ml PBS aufgenommenen Zellen erneut filtriert; dies wurde noch einmal wiederholt. Die Überstände wurden vereint, für 7 Min bei 580 x g zentrifugiert und das aus Hepatozyten, intrahepatischen Leukozyten und Erythrozyten bestehende Sediment über einem Percoll-Dichtegradienten (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) zentrifugiert. Hierzu wurde das Zellgemisch in 30 ml 36 %iger Percoll-Lösung aufgenommen und auf zwei Zentrifugenröhrchen, gefüllt mit jeweils 15 ml 72-prozentiger Percoll-Lösung, vorsichtig verteilt. Unter den gewählten Zentrifugationsbedingungen, 30 Min bei 20°C und 1118 x g bei langsamer Beschleunigung und ausgeschalteter Bremse, reichert sich die Leukozyten in der Interphase des Gradienten an. Die an der Oberfläche angereicherten Hepatozyten wurden abgesaugt, bevor die Interphase großzügig abgenommen und über Gase filtriert wurde. Die Leukozyten wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 7 Min bei 580 x g zentrifugiert. Kontaminierende Erythrozyten wurden mit einem Lysepuffer (siehe unten) entfernt. Die Lyse wurde durch Verdünnung mit PBS nach zwei Minuten beendet. Ein letztes Mal

wurden die Zellen für 7 Min bei 580 x g zentrifugiert. Der Anteil der so isolierten Leukozyten wurde in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, wobei nur vitale, nicht mit Trypan-Blau gefärbte Zellen berücksichtigt wurden.

- ◆ PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung): 140 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 7,2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1,47 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2.
- ◆ Lysepuffer (10-fach konzentriert): 1,68 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1 mol/L  $\text{KHCO}_3$ , 12 mmol/L EDTA

### **3.3.2 Isolierung von Milzleukozyten**

Die Milz wurde durch ein Sieb (Cell Strainer, 70  $\mu\text{m}$ , Fa. Falcon) passiert, die Gewebesuspension in PBS aufgenommen und für 7 Min bei 580 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Erythrozyten mit Lysepuffer selektiv zerstört. Die Lyse wurde nach 2 Min durch Verdünnen mit 20 ml PBS gestoppt und die Zellsuspension über Gase (Porengröße 100  $\mu\text{m}$ ) filtriert, um Gewebereste zu entfernen. Dann wurde die Suspension erneut zentrifugiert (7 Min bei 580 x g). Entsprechend ihrem Verwendungszweck wurden nun die Leukozyten in PBS oder RPMI 1640 aufgenommen.

## **3.4 Durchflusszytometrische Untersuchungen**

Mit der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen anhand verschiedener phänotypischer Charakteristika unterscheiden und sortieren. Dabei werden verschiedene optische Signale gemessen, die beim Durchtritt der Zellen durch einen Laserstrahl entstehen. Die Signale werden von verschiedenen Detektoren registriert und nach Intensität und Farbe des Fluoreszenzlichtes getrennt digital gespeichert. Detektiert werden können das Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Light Scatter, FSC), das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Light Scatter, SSC) und von Fluoreszenzfarbstoffen emittiertes Fluoreszenzlicht. Fluoreszenzfarbstoffe sind z.B. Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC, Grünfluoreszenz, Emissionsmaximum: 530 nm) und Phycoerythrin (PE, Rotfluoreszenz, Emissionsmaximum: 585 nm). Das Vorwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht ein Maß für die Granularität der Zellen

ist. Die Messung des Fluoreszenzlichts ermöglicht die Bestimmung einer Vielzahl von Merkmalen, entsprechend der Anzahl an Antikörpern unterschiedlicher Spezifität (Tab. 3.1), die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert werden. So können z.B. verschiedenste Oberflächenmoleküle nachgewiesen werden (Abb. 1.1).

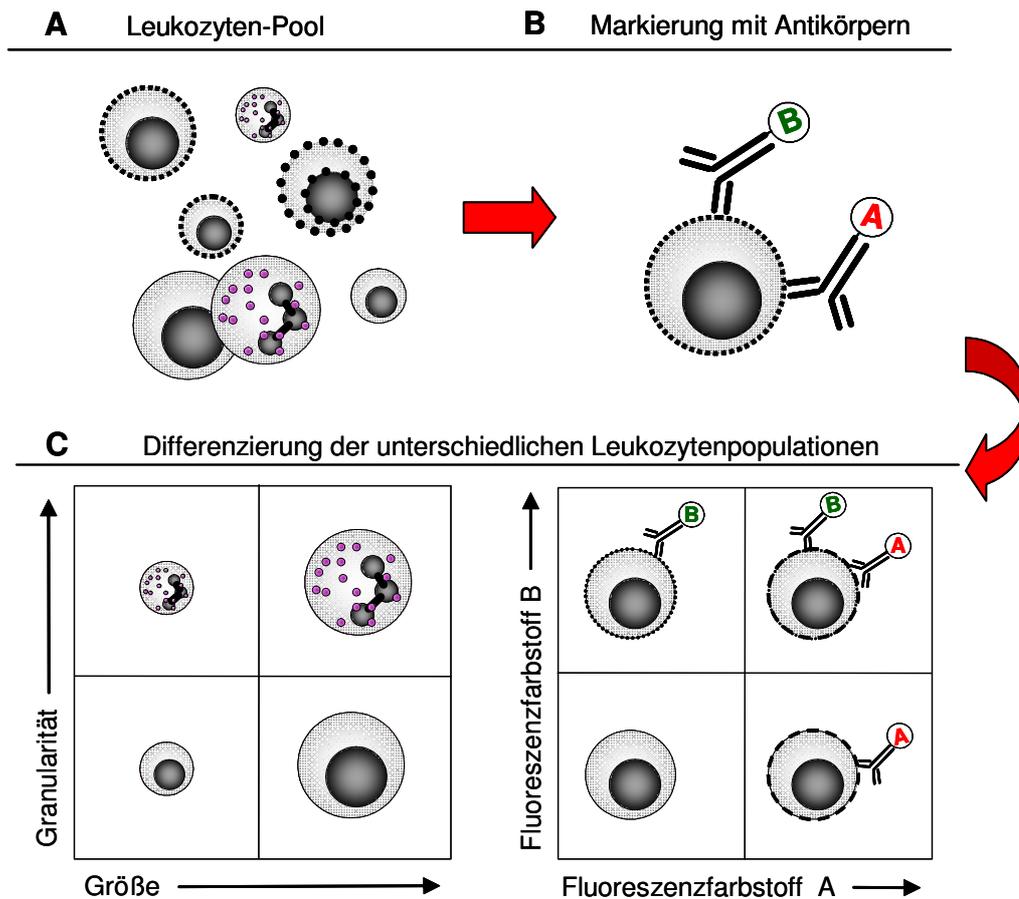


Abb. 3.1: Schematische Darstellung zur Methode der durchflusszytometrischen Zellanalyse: Die Leukozyten (A) werden mit den monoklonalen Antikörpern A und B inkubiert, um unterschiedliche Subpopulationen anhand bestimmter Oberflächenmoleküle zu identifizieren (B). Die Antikörper sind selbst mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, wodurch sich die Zellen im Durchflusszytometer analysieren lassen. Die Zellen lassen sich nach Größe und Granularität vorsortieren und anschließend die unterschiedlichen Zellpopulationen je nach Bindung der Antikörper A und B identifizieren.

*Färbeprotokoll: Inkubation der Zellen mit Antikörpern:*

Zur Färbung wurden pro Analyse jeweils  $5 \times 10^5$  Leukozyten in  $50 \mu\text{l}$  PBS aufgenommen und mit Maus-anti-Ratte Antikörpern unterschiedlicher Spezifität

(Tab. 3.1) für 20 Min inkubiert. Die Antikörper waren entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-Isothiocyant oder Phycoerythrin konjugiert (Anhang Tab. 10.1). Die optimale Antikörperkonzentration wurde in Vorversuchen bestimmt. Nach der Inkubation wurden die nicht gebundenen Antikörper ausgewaschen und die Zellen in 300 µl PBS aufgenommen. Wurden die beiden unkonjugierten Antikörper MN-4 und NDS-60 verwendet, so wurden die Zellen in einem zweiten Schritt mit einem PE-konjugierten Sekundärantikörper (Esel-anti-Maus) inkubiert. Eine Isotypenkontrolle mit Maus IgG<sub>1κ</sub> (Becton Dickinson Bioscience Europe, Heidelberg, Deutschland) wurde durchgeführt, um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen.

Tab. 3.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper, ihre Spezifität und Bezugsquelle. Ein detailliertes Färbeprotokoll ist im Anhang Tab. 10.1 aufgeführt. Als Sekundärantikörper wurde der „Esel-anti-Maus“-Antikörper von Jackson Immuno Research (Dianova, Hamburg) verwendet. Sämtliche Zellen wurden mit 7AAD auf ihre Vitalität überprüft. Bis auf die gekennzeichneten Antikörper wurden sämtliche Antikörper über Serotec, Oxford, Großbritannien bezogen. <sup>1)</sup> Jackson ImmunoResearch Laboratories INC., USA. <sup>2)</sup> Caltag Laboratories, Burlingame, Kanada. TCR = T-Zellrezeptor

---

**Antikörper    Oberflächenepitop**

---

Ox-1	CD45	alle Zellen hämatopoetischen Ursprungs außer Erythrozyten
Ox-18	MHC I	RT1 <sup>A</sup> monomorphe Determinante des Klasse-I MHC (Ratte)
MN-4 <sup>1)</sup>	MHC I	RT1 <sup>avl</sup> -, RT1 <sup>rl</sup> -Haplotyp (PVG) Klasse-I MHC, spezifisch für Dark Agouti
NDS-60 <sup>1)</sup>	MHC I	RT1 <sup>l</sup> -Haplotyp Klasse-I MHC, spezifisch für Lewis
Ox-6	MHC II	RT1 <sup>B</sup> monomorphe Determinante des MHC Klasse-II
R-73	TCR αβ	αβ T-Zell Rezeptor-positive T-Lymphozyten
W3/25 <sup>2)</sup>	CD4	CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten, Monozyten
Ox-8	CD8	α Kette des CD8 Moleküls
Ox-22	CD45RC	Subpopulationen der CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten
Ox-39	CD25	IL-2 Rezeptor, aktivierte T-Lymphozyten
Ox-7	CD90	Thy1.1 (periphere T-Lymphozyten)
10/78	CD161	NKR-P1A (Natürliche Killerzellen)
Ox-33	CD45RA	B-Lymphozyten
Ox-42	CD11b/c	CR-3 Zellrezeptor für Komplementfaktor C3bi, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen
ED-2	CD163	Makrophagen, Kupffer-Zellen

---

### Durchflusszytometrische Analyse

Die Zellen wurden mit dem Durchflusszytometer FACScan (Becton Dickinson GmbH Europa, Heidelberg Deutschland) gemessen. Bei jedem Messvorgang wurden 10.000 Zellen gezählt und die so gewonnenen digitalen Daten mit dem Programm WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, The Scripps Research Institute) graphisch und statistisch ausgewertet. Mit dem Antikörper Ox-1 (anti-CD45) wurden die Leukozyten identifiziert (Abb. 3.2).

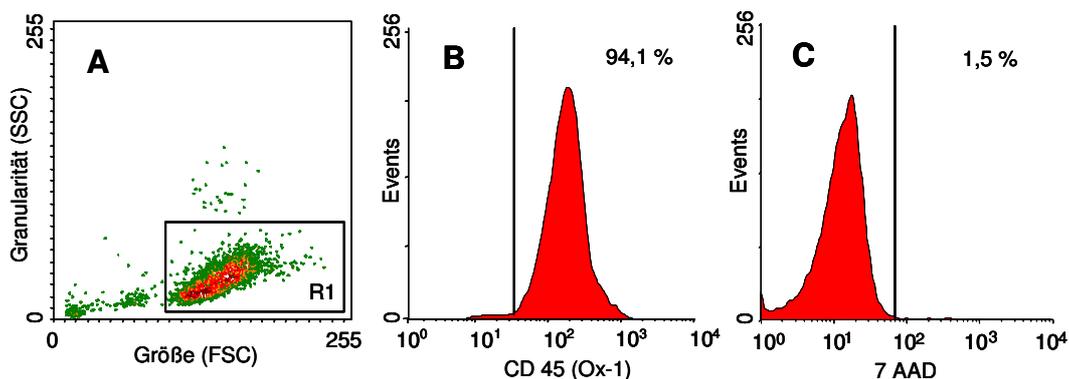


Abb. 3.2: Die über Percoll angereicherten intrahepatischen Leukozyten stellen eine einheitliche Population dar (A). Die in R1 (Region 1) befindlichen Zellen sind CD45 positiv ( $94,1 \pm 1,6$  Prozent) (B) und 7 AAD-negativ (ca. 99 Prozent) (C). 7 AAD: 7-Amino-Actinomycin D (Via-Probe™) von Becton Dickinson Biosciences Europe, Heidelberg, Deutschland.

### Durchflusszytometrische Sortierung

Mit dem Zellsortierer FACS-VantageSE (Becton Dickinson Bioscience Europe, Heidelberg, Deutschland) (ausgestattet mit drei Lasern, Wellenlänge 488 nm, 351-664 nm und 647 nm) wurden die beiden T-Zell-Populationen CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> aus den Leukozyten von Leber und Milz aussortiert (Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg). Dazu wurden  $1 \times 10^8$  Leukozyten in 1 ml PBS aufgenommen und mit jeweils 30 µg der Antikörper W3/25 (PE-konjugiert) und Ox-22 (FITC-konjugiert) für 20 Min inkubiert und innerhalb von sechs Stunden steril sortiert. Dabei wurde eine Reinheit der einzelnen Leukozytenpopulationen von  $\geq 97,5$  Prozent erreicht (Abb. 3.3).

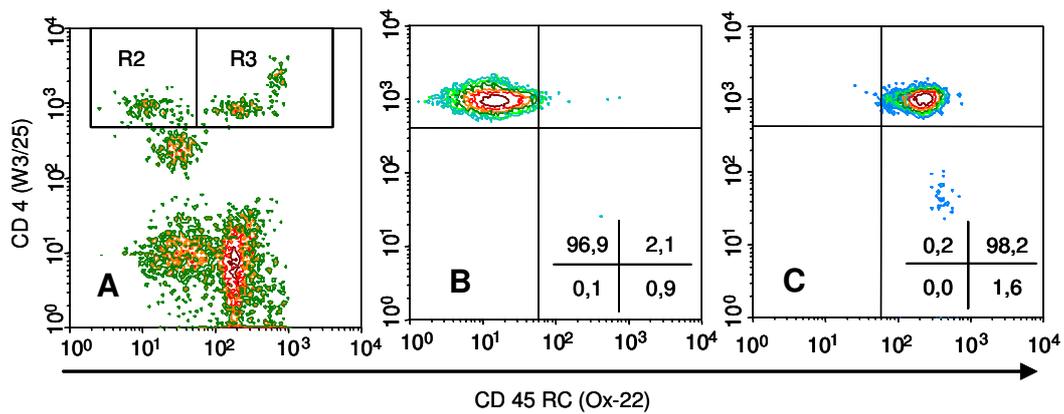


Abb. 3.3: Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer Leukozyten in CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> (R2) und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> (R3) T-Lymphozyten vor (A) und nach (B-C) Sortierung mit dem Zellsorter. Durch die durchflusszytometrische Isolierung wurde eine Reinheit der beiden CD4<sup>+</sup> Subpopulationen von über 95 Prozent erreicht. Die Zahlenwerte in B und C entsprechen der prozentualen Verteilung aller gemessenen Ereignisse nach Sortierung. Die aufgereinigten Lymphozyten waren zu über 90 Prozent vital.

Tab. 3.2: Übersicht über die zur Zytokinanalyse notwendigen Zellmengen und der daraus resultierenden Anzahl an Versuchstieren. Die Zellausbeute für syngen transplantierte DA-Lebern betrug absolut  $8,3 \pm 1,5 \times 10^6$ , entsprechend  $1,5 \pm 0,5 \times 10^6$  pro Gramm Leber (A.2, Tab. 10.5.)

	DA	Tag 3	Tag 30
<b>A)</b>	<b>Isolierte intrahepatische Leukozyten [x 10<sup>6</sup>]</b>		
Zellzahl/g Leber	1,8 ± 0,8	8,2 ± 0,39	4,9 ± 2,9
Zellzahl absolut	16,0 ± 7,3	73,1 ± 38,2	44,8 ± 21,7
<b>B)</b>	<b>Prozentualer Anteil der CD4<sup>+</sup>CD45RC T-Lymphozyten [% der IHL]</b>		
CD45RC <sup>pos</sup>	12,7 ± 3,0	4,6 ± 0,5	7,1 ± 1,9
CD45RC <sup>neg</sup>	6,9 ± 1,5	21,6 ± 1,9	11,1 ± 0,9
<b>C)</b>	<b>Absoluter Anteil der CD4<sup>+</sup>CD45RC T-Lymphozyten [x 10<sup>6</sup>]</b>		
CD45RC <sup>pos</sup>	2,0 ± 0,5	3,4 ± 0,4	3,2 ± 0,9
CD45RC <sup>neg</sup>	1,1 ± 0,2	15,8 ± 1,4	5,0 ± 0,4
<b>D)</b>	<b>Benötigte Anzahl von Tieren für je eine Zytokin-Analyse</b>		
Mindestanzahl	4	2	3

### *Kalkulation der Versuchstierzahlen (Tab. 3.2)*

Nach durchflusszytometrischer Sortierung der CD4<sup>+</sup>CD45RC T-Lymphozyten wurden die in Kapitel 3.6 beschriebenen Zytokinanalysen durchgeführt. Dazu wurden mindestens  $1,2 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten benötigt. Diese Zellzahlen ließen sich jedoch nicht aus einer einzelnen Leber gewinnen, weshalb die Leukozyten mehrerer Lebern vereint wurden. Für die Zytokinanalyse der CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten der Milz reichte pro Versuch ein Organ.

## **3.5 Stimulation isolierter Leukozyten**

In verschiedenen Versuchsreihen wurden unsortierte Leukozyten und sortierte T-Lymphozyten *in vitro* stimuliert. Die aufgereinigten CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten wurden in 600 µl PBS ( $6 \times 10^5$  Zellen) mit jeweils 1 µg der Antikörper R73 (anti-TCR) und JJ319 (anti-CD28; Fa. Serotec) für 20 Min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in 900 µl RPMI 1640 aufgenommen und auf sechs Vertiefungen einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen verteilt. Die Vertiefungen waren 24 Stunden zuvor mit einem Ziege-anti-Maus Antikörper (1,5 µg Antikörper pro Vertiefung) (115-005-008 Jackson Immuno Research Laboratories INC.) beschichtet worden. Als Negativkontrolle dienten mit R73 und JJ319 inkubierte T-Lymphozyten in nicht beschichteten Vertiefungen. Als Positivkontrolle wurden T-Lymphozyten mit Ionomycin (500 ng/ml Endkonzentration) (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland) und PMA (10 ng/ml Endkonzentration) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für 3 Stunden stimuliert. Unsortierte Leukozyten wurden unter gleichen Bedingungen für einen Zeitraum von 3, 8 und 16 Stunden stimuliert.

### 3.6 Bestimmung des Zytokinmusters

Das Zytokinmuster der stimulierten CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten wurde mit ELISA und RT-PCR-ELISA untersucht.

#### 3.6.1 Nachweis sezernierter Zytokine mittels ELISA

Die Kulturüberstände wurden auf Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2), IL-10 und IL-13 im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) überprüft. Dies ist ein Verfahren, das auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion basiert. Für den hier durchgeführten Sandwich-ELISA wurden „BioSource Cytoscreen kits“ (BioSource International, Camarillo, California, USA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet. Um die Konzentration (in pg/ml) der einzelnen Zytokine zu bestimmen, wurde die Farbintensität der Enzymreaktion als optische Dichte (OD) bei 450 nm mit einem ELISA-Reader (Dynatech Microplate Reader MRX) gemessen. Die Nachweisgrenze für INF- $\gamma$  lag bei 13 pg/ml, für IL-2 und IL-10 bei 5 pg/ml und für IL-13 bei 1,5 pg/ml.

#### 3.6.2 Nachweis von Zytokinexpression mit der RT-PCR-ELISA Methode

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine enzymatisch gesteuerte Reaktion, mit der sich definierte DNA-Sequenzen *in vitro* vervielfältigen lassen. In Kombination mit einer vorgeschalteten enzymatischen Reaktion, der reversen Transkription (RT), die mRNA in cDNA (*complementary DNA*) überführt, lässt sich die Expression bestimmter Gene überprüfen (Van der Borght et al., 1999).

Die Gesamt-RNA wurde aus  $6 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) isoliert, luftgetrocknet und in 40  $\mu$ l 1 mmol/L Natriumcitrat (pH 6,4) (Fa. Ambion, AMS Biotechnology, Wiesbaden) aufgenommen. Anschließend wurde cDNA mit Oligo-dT16-Primern synthetisiert. Hierzu wurden 5  $\mu$ l RNA in einem 20  $\mu$ l Ansatz in cDNA umgeschrieben (Angaben als Endkonzentration): 1 x PCR Puffer (10 x Stammlösung: 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,

2,5 µmol/L Oligo-dT16-Primer, 1 mmol/L dNTP-Gemisch (dNTP = Desoxynukleotidtriphosphat; Promega, USA), 1 U/µl RNase-Inhibitor und 2,5 µmol/L MuLV Reverse Transkriptase. Alle Reagenzien wurden von der Firma Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland, bezogen.

Für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion wurden 2,5 µl cDNA in 25 µl-Ansätze vorgelegt: 1 x PCR Puffer II (10x Stammlösung: 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 U AmpliTaq Gold (alle Reagenzien von Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland) und 0,5 µmol/L der entsprechenden Primer (Tab. 3.3). Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Positivkontrolle ("house-keeping" Gen) verwendet.

Tab. 3.3: Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide („primer“). Angabe der Produktlänge in bp (Basenpaare). Die „Annealing-Temperatur“ der Primer in °C ist ebenfalls angegeben. Die Primer-Orientierung: for = forward; rev = reverse. Die verwendeten Primer basieren auf publizierten Sequenzen: TNF-α (Farges O et al., 1995); IFN-γ und IL-10 (Siegling A et al., 1994); GAPDH (Kruse JJ et al., 1999); IL-13 (Gillespie KM et al., 1996). Sämtliche Primer wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Der jeweilige forward Primer war digoxigeniert.

Primer	bp	Temp.		Sequenz 5' → 3'
<b>INF-γ</b>	419	62°C	For Rev	CCC TCT CTG GCT GTT ACT GC CTC CTT TTC CGC TTC CTT AG
<b>TNF-α</b>	468	65°C	For Rev	CTC AGC CTC TTC TCA TTC C GCG GAG AGG AGG CTG ACT
<b>IL-10</b>	371	55°C	For Rev	TCC ATC CGG GGT GAC AAT AAC AAT CAT TCT TCA CCT GCT CC
<b>IL-13</b>	280	55°C	For Rev	CAG GGA GCT TAT CGA GGA GC AAG TTG CTT GGA GTA ATT GAG C
<b>GAPDH</b>	319	62°C	For Rev	GGT CGG TGT GAA CGG ATT TG GTG AGC CCC AGC CTT CTC CAT

Jeweils 40 µl der Zytokin-Amplifikate wurden nach einem 10-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C mit 1 µl (dies entspricht 10 µmol/L) der biotinilierten Sonde (Tab. 3.4) bei 55°C für 30 Minuten inkubiert ("Annealing"-Schritt). Als nächstes wurden die so biotinilierten Amplifikate in jeweils 2

Vertiefungen einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen („High Bind Streptawell-Platten“ der Firma Roche, Penzberg, Deutschland) überführt, in die bereits jeweils 90 µl einer Mischung aus Denaturierungs- und Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:10 (Roche, Penzberg, Deutschland) vorgelegt waren. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde in jede Vertiefung 50 µL einer 0,5-prozentigen Gelatine-Lösung (Endkonzentration: 0,16 Prozent) verteilt und bei 4°C über Nacht (16 Stunden) inkubiert.

Tab. 3.4: Die biotinierten Sonden für das jeweilige Amplifikat. Sonden und Amplifikate wurden bei 55°C für 30 Minuten inkubiert.

<b>Primer</b>	<b>Sonde (Sequenz 5' → 3')</b>
<b>INF-γ</b>	CTA GGC TTT CAA TGA GTG TGC C
<b>TNF-α</b>	GGC TAC GGG CTT GTC ACT CG
<b>IL-10</b>	CCA TGG TTC TCT GCC TGG GG
<b>IL-13</b>	GAA GCC ACA TCC GAG GCC TT
<b>GAPDH</b>	CGC CAG TAG ACT CCA CGG CA

Am Folgetag wurden die Vertiefungen mit jeweils 200 µl einer Lösung aus 0,5-prozentiger Tween-20 in PBS dreimal gewaschen. Anschließend wurde der Peroxidase-konjugierte anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche, Penzberg, Deutschland) mit 0,05-prozentiger Tween-Lösung 1:5000 verdünnt, jeweils 100 µL auf die Vertiefungen verteilt und für eine Stunde inkubiert. Die Vertiefungen wurden viermal mit jeweils 200 µl einer 0,5-prozentigen Tween-PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden 100 µl vom Peroxidasesubstrat BM Blue (Roche, Penzberg, Deutschland) zugegeben, für 25 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Reaktion mit 100 µl Schwefelsäure (2,5 mol/L) abgestoppt (Farbumschlag nach gelb). Die Mikrotiterplatten wurden im ELISA-Reader (Dynatech Microplate Reader MRX) bei 450 nm Wellenlänge innerhalb der nächsten halben Stunde gemessen. Weitere Informationen zum PCR-ELISA Verfahren sind in der Inaugural-Dissertation von Frau Kerteß zu finden (Kerteß T, 2007).

### **3.7 Statistische Auswertung**

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

## 4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, die mögliche Beteiligung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten an der Lebertransplantat-Spontantoleranz zu untersuchen. Hierzu wurden intrahepatische sowie periphere Leukozyten mit der Durchflusszytometrie phänotypisiert. Zusätzlich wurden zwei Subpopulationen von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die CD45RC<sup>pos</sup> und CD45RC<sup>neg</sup>, molekularbiologisch analysiert.

### 4.1 Die Immunantwort nach Lebertransplantation

Die Qualität der durch das Lebertransplantat im Empfänger ausgelösten Immunantwort unterscheidet sich nach Wahl der Spender-Empfänger-Kombination (Abb. 1.2). Während LEW-Ratten als Empfänger die allogenen Lebertransplantate von DA-Spendern akut abstoßen, akzeptieren DA-Ratten allogene Lebertransplantate von Lewis-Ratten. Aus diesem Grund wurde die LEW-nach-DA Kombination als Lebertransplantat-Spontantoleranzgruppe (TOL) bezeichnet. Als syngene Kontrollgruppe (SYN) wurde die Kombination DA-nach-DA verwendet. Sämtliche Empfänger beider Versuchsgruppen überlebten die Lebertransplantation langfristig (Überlebenszeit > 300 Tage). In vorangegangenen Arbeiten der Gruppe wurde gezeigt, dass der Beobachtungszeitraum in eine Früh- und eine Spätphase nach Transplantation unterteilt werden kann (Otto C et al., 2002). Basierend auf diesen Untersuchungen wurde als Analysezeitpunkte für die Frühphase Tag 3 und für die Spätphase Tag 30 gewählt.

#### 4.1.1 Die Lebertransplantat-Spontantoleranzgruppe (TOL)

Lebertransplantat-Empfänger des Stammes DA zeigen das Phänomen der Lebertransplantat-Spontantoleranz, wenn sie allogene Lebertransplantate von LEW-Spendern erhalten. Spontantoleranz bedeutet, dass diese Transplantate ohne Immunsuppression langfristig toleriert werden. Werden hingegen andere vaskularisierte Organe (z.B. Herz) von LEW-Spendern auf DA-Empfänger ohne Immunsuppression transplantiert, so werden diese akut abgestoßen (Tab. 4.1).

Die Lebertransplantat-Spontantoleranz weist sämtliche Merkmale der antigenspezifischen Toleranz auf (Anhang A.2).

Tab. 4.1: Nachweis immunologischer Toleranz nach Lebertransplantation. Hierzu erhielten Tiere der Versuchsgruppen (Gr.) 1-5 Spender-Herzen in heterotoper Position. Tiere der TOL- und SYN-Gruppe erhielten 100 Tage nach Lebertransplantation Herzen von Lewis- (LEW) oder Wistar Furth-Spendern (WF) (Gruppe 3-5). Bei den Versuchsgruppen 1 und 2 handelt es sich um Kontrollen. Erhielten lebertransplantierte Tiere der TOL-Gruppe allogene Herzen von LEW-Spendern, so wurden diese spontan toleriert. Erhielten die Tiere hingegen Herzen von einem Drittstamm (hier WF), so wurden diese akut abgestoßen. Auch syngene transplantierte DA-Empfänger stießen ihre allogenen Herztransplantate akut ab. n= Anzahl der Tiere pro Gruppe.

Gr.	Herz-Spender	Empfänger	Funktionsdauer	immunologische Reaktion	n
1	LEW	DA	6 ± 2 Tage	akute Abstoßung	5
2	WF	DA	10 ± 1 Tage	akute Abstoßung	3
3	LEW	LTx TOL	unbegrenzt	Toleranz	2
4	LEW	LTx SYN	7 ± 2 Tage	akute Abstoßung	3
5	WF	LTx TOL	13 ± 1 Tage	akute Abstoßung	3

Histologische und quantitative Analysen von Lebertransplantaten und Milzen der Empfängertiere belegen, dass eine Immunantwort nicht nur in den peripheren lymphatischen Organen, sondern auch im Lebertransplantat selbst zu messen war. So wurden transplantierte Lebern von immunkompetenten Zellen des Empfängers massiv infiltriert (Kauczok J, 2005). T-Lymphozyten dominierten dabei das Infiltrat, zudem wiesen die beiden Subpopulationen,  $CD4^+CD45RC^{neg}$  und  $CD4^+CD45RC^{pos}$ , einen dynamischen Verlauf auf. In nicht-transplantierten Rattenlebern lag das Verhältnis von aktivierten ( $CD45RC^{neg}$ ) zu nicht-aktivierten ( $CD45RC^{pos}$ )  $CD4^+$  T-Lymphozyten bei 1:2. Nach Lebertransplantation änderte sich das Verhältnis auf 3:1 bis Tag 3, verringerte sich bis Tag 7 auf 2:1 und stieg erneut bis Tag 30 auf 4:1 an. An Tag 100 entsprach das Verhältnis der aktivierten zu den nicht-aktivierten  $CD4^+$  T-Lymphozyten wieder dem von nicht-transplantierten Lebern (A.2, Abb. 10.3). Diese Daten lassen vermuten, dass Lebertransplantat-Spontantoleranz auf einer aktiven immunologischen Auseinandersetzung des Empfänger-Immunsystems mit den Alloantigenen des Lebertransplantates beruht.

### 4.1.2 Die Syngene Kontrollgruppe (SYN)

Um zu zeigen, dass die in der Lebertransplantat-Spontantoleranzgruppe gemessene Immunaktivierung nicht durch den operativen Eingriff ausgelöst wurde, wurden syngen transplantierte DA-Tiere als Kontrollgruppe verwendet.

Die histologischen und quantitativen Untersuchungen syngen transplantierte Lebern wiesen im Vergleich zu nicht-transplantierten DA-Lebern keine wesentlichen Unterschiede auf. Wie erwartet, wurden keine lymphozytären Infiltrate im periportalen Bereich der Leberläppchen als typische Zeichen der akuten Abstoßung beobachtet. Ebenso waren keine nekrotischen Hepatozyten zu finden (Gassel H-J et al., 2002). Auch unterschied sich die Anzahl isolierter intrahepatischer Leukozyten aus syngen transplantierten Lebern mit  $1,5 \pm 0,5 \times 10^6$  pro Gramm Lebergewicht nicht von der nicht-transplantierten DA-Lebern mit  $1,8 \pm 0,8 \times 10^6$  pro Gramm Lebergewicht (A.2, Abb. 10.1).

## 4.2 Zytokinmuster der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

In vorangegangenen Arbeiten der Gruppe wurde gezeigt, dass ausschließlich Lebertransplantate der Spontantoleranzgruppe IL-13 positive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Spätphase aufweisen. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche der beiden CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen, die CD45RC<sup>neg</sup> oder CD45RC<sup>pos</sup>, IL-13 positiv ist.

### 4.2.1 Zytokinprofil CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten im ELISA

Aufgereinigte CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten wurden mit den beiden Antikörpern R73 und JJ319 stimuliert und anschließend die Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10 und IL-13 im ELISA bestimmt. Sämtliche an Tag 3 und Tag 30 aus Lebertransplantaten isolierte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten ließen sich stimulieren. In den Kulturüberständen wurde IL-2 in einer Konzentration von 200 bis 270 pg/ml nachgewiesen, ebenso IFN- $\gamma$  (zwischen 50-200 pg/ml), IL-10

(zwischen 40-180 pg/ml) und IL-13 (zwischen 40-100 pg/ml). Auch für die aufgereinigten  $CD4^+CD45RC^{pos}$  und  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten aus Milzen lebertransplantierten Tiere wurden diese Zytokine im ELISA nachgewiesen (Abb. 4.1 und Abb. 4.2).

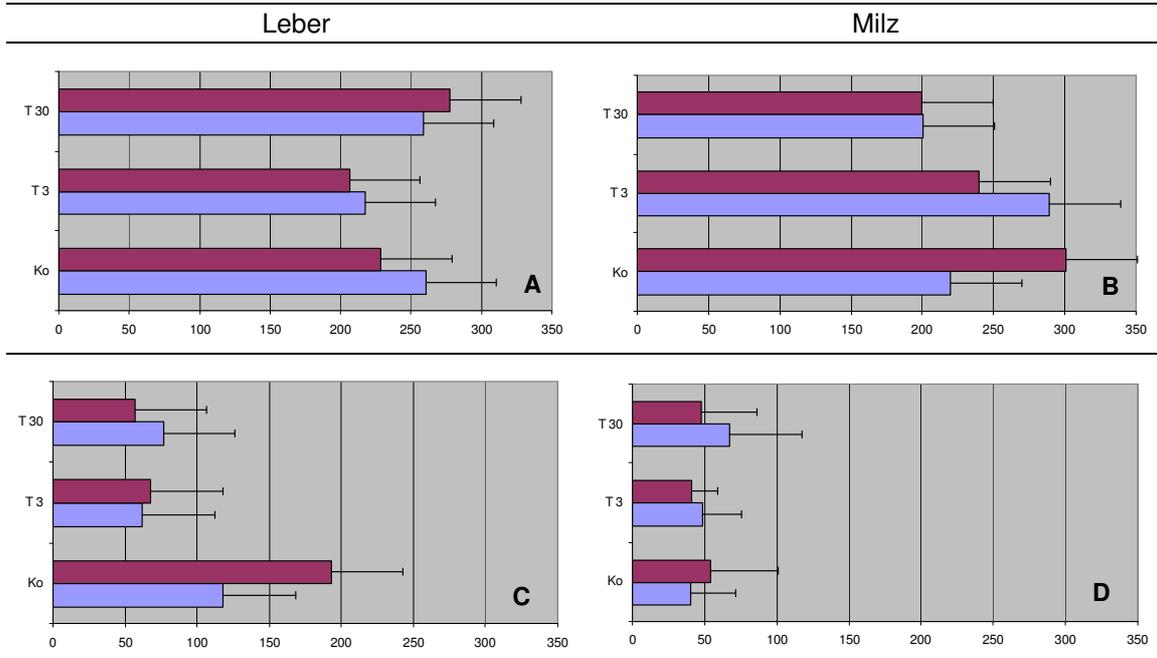


Abb. 4.1: Nachweis von IL-2 (A, B) und INF- $\gamma$  (C, D) im Kulturüberstand stimulierter  $CD4^+CD45RC^{pos}$  und  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten im ELISA. Die aufgereinigten  $CD4^+CD45RC$  T-Lymphozyten aus Lebern (A, C) und Milzen (B, D) wurden für 3 Stunden *in vitro* stimuliert. Dargestellt ist der Anteil an IL-2 bzw. INF- $\gamma$  in pg/ml als Mittelwert und Standardabweichung von wenigstens drei Zellisolierungen. Ko = Kontrollgruppe, T3 bzw. T30 = TOL-Gruppe 3 bzw. 30 Tage nach Lebertransplantation.

■  $CD4^+CD45RC^{pos}$     ■  $CD4^+CD45RC^{neg}$

Die Daten zum Nachweis von Zytokinen im Zellkulturüberstand zeigen, dass sich die beiden Subpopulationen  $CD4^+CD45RC^{pos}$  und  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten nicht in Qualität und Quantität der untersuchten Zytokine unterscheiden. Dieses Ergebnis ist unabhängig davon, ob die Zellen aus spontan-toleranten Lebertransplantaten oder den Milzen der Tiere isoliert wurden. Auch ist kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Analysezeitpunkten, Tag 3 und Tag 30 nach Lebertransplantation festzustellen. Einzig IL-10 stellte eine

Ausnahme dar. Für die an Tag 30 isolierten T-Lymphozyten wurde bis zu viermal weniger IL-10 nachgewiesen als am Tag 3. Dies gilt sowohl für die aus den Lebertransplantaten als auch Milzen isolierten Zellen. Für IL-13 war ein leichter Anstieg an Tag 30 festzustellen.

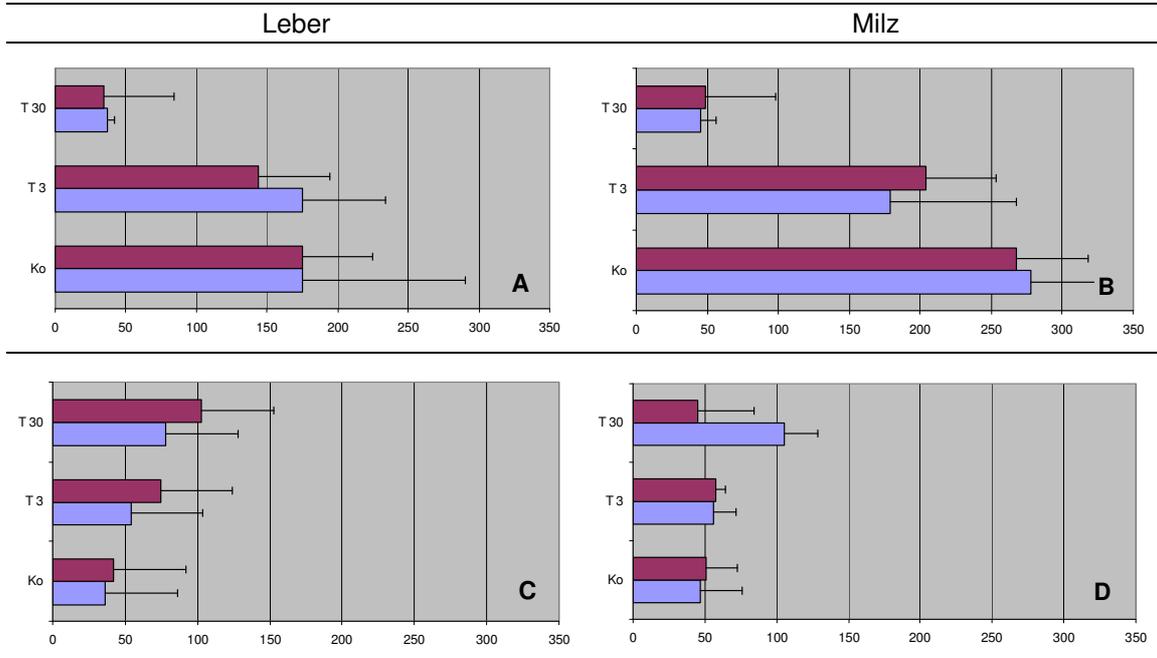


Abb. 4.2: Nachweis von IL-10 (A, B) und IL-13 (C, D) im Kulturüberstand stimulierter CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten im ELISA. Die aufgereinigten CD4<sup>+</sup>CD45RC T-Lymphozyten aus Lebern (A, C) und Milzen (B, D) wurden für 3 Stunden *in vitro* stimuliert. Dargestellt ist der Anteil an IL-10 bzw. IL-13 in pg/ml als Mittelwert und Standardabweichung von wenigstens drei Zellisolierungen. Ko = Kontrollgruppe, T3 bzw. T30 = TOL-Gruppe 3 bzw. 30 Tage nach Lebertransplantation.

■ CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup>    ■ CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup>

#### 4.2.2 Zytokinprofil CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten im RT-PCR-ELISA

In einem nächsten Schritt wurde mit der RT-PCR-ELISA Methode die relative Expression der Zytokine INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-13 bestimmt. In Tab. 4.2 sind die Daten zum RT-PCR-ELISA aufgelistet. Als eindeutige Zytokinexpression wurde gewertet, wenn der gemessene OD-Wert für ein bestimmtes Zytokin-Amplifikat größer war als der OD-Wert für das GAPDH-Amplifikat und

somit das Verhältnis beider Werte größer als 1 war ( $OD_{\text{Zytokin}}/OD_{\text{GAPDH}} > 1$ ) (siehe Tab. 4.2). Diese Verhältnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung aus drei, jedoch maximal aus fünf Parallelwerten in Abb. 4.3 dargestellt.

Tab. 4.2: Nachweis spezifischer mRNA der Zytokine aus  $CD4^+CD45RC^{\text{pos}}$  und  $CD4^+CD45RC^{\text{neg}}$  T-Lymphozyten nach *in vitro* Stimulierung mit der kombinierten RT-PCR-ELISA Methode. Die Zellen wurden aus spontantoleranten Lebertransplantaten an den Tagen 3 und 30 nach Transplantation isoliert. Dargestellt ist die Anzahl der Versuche, bei denen ein positives Signal gemessen wurde (erste Zahl) im Vergleich zur Anzahl der durchgeführten Versuche (zweite Zahl). 2 / 3 bedeutet demnach, dass in zwei von drei Versuchen der Quotient der Optischen Dichte für  $OD(\text{Zytokin}) / OD(\text{GAPDH}) > 1$  war. In Abb. 4.3 sind sämtliche Daten graphisch dargestellt. Kontrolle: T-Lymphozyten, die aus nicht-transplantierten Lebern isoliert wurden.

Zytokin	Kontrolle		Tag 3		Tag 30	
	$CD45RC^{\text{pos}}$	$CD45RC^{\text{neg}}$	$CD45RC^{\text{pos}}$	$CD45RC^{\text{neg}}$	$CD45RC^{\text{pos}}$	$CD45RC^{\text{neg}}$
INF- $\gamma$	3 / 3	3 / 3	2 / 3	5 / 5	3 / 3	5 / 5
TNF- $\alpha$	3 / 3	3 / 3	3 / 3	5 / 5	3 / 3	3 / 5
IL-10	1 / 3	1 / 3	0 / 3	5 / 5	0 / 3	0 / 5
IL-13	3 / 3	3 / 3	0 / 3	3 / 5	1 / 3	4 / 5

Nach Tab. 4.2 wurden die beiden Th1-Zytokine INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  wesentlich häufiger nachgewiesen (in der Regel in allen Versuchen) als die beiden Th2-Zytokine IL-10 und IL-13. Dies mag auch an der viel stärkeren Expression der Th1-Zytokine liegen (Abb. 4.3). Im Gegensatz zu den Daten zur Zytokinsekretion (Abb. 4.1, Abb. 4.2) zeigen die Daten zum semiquantitativen Nachweis der Zytokin-mRNA (Abb. 4.3) doch einen deutlichen Unterschied zwischen  $CD4^+CD45RC^{\text{pos}}$  und  $CD4^+CD45RC^{\text{neg}}$  T-Lymphozyten. So sind es die  $CD4^+CD45RC^{\text{neg}}$  T-Lymphozyten, die stärker die Th2-Zytokine IL-10 und IL-13 exprimieren, während die  $CD4^+CD45RC^{\text{pos}}$  T-Lymphozyten stärker die Th1-Zytokine INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  exprimieren. Auch gibt es Unterschiede in der Expression von Th2-Zytokinen zwischen  $CD4^+CD45RC^{\text{neg}}$  T-Lymphozyten aus Lebertransplantaten und Milzen.

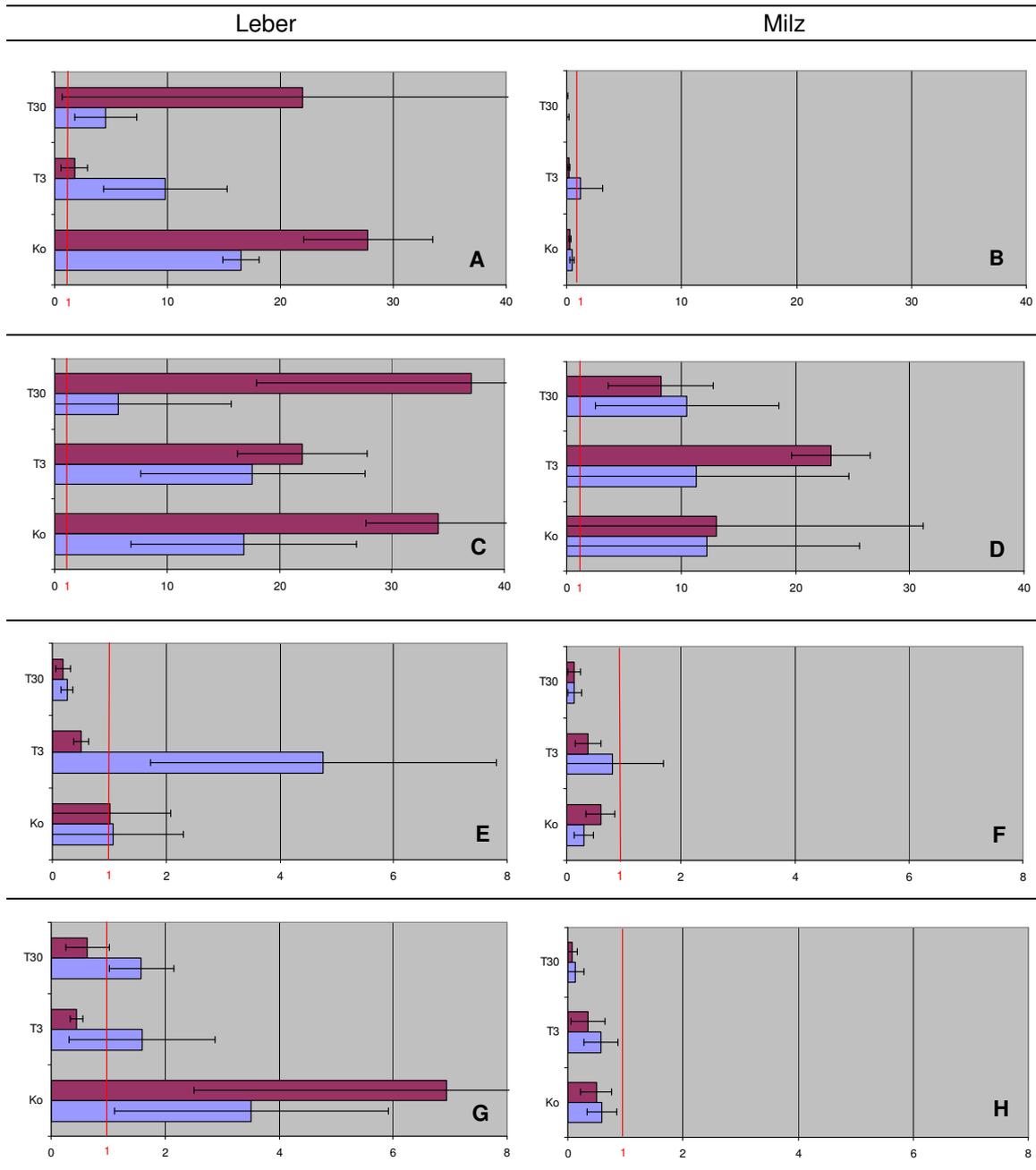


Abb. 4.3: Semiquantitativer Nachweis von Amplifikaten der Zytokine  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-10}$  und  $\text{IL-13}$  im ELISA als Maß für die relative Anzahl spezifischer Zytokin-mRNA. Untersucht wurden  $\text{CD4}^+\text{CD45RC}^{\text{pos}}$  und  $\text{CD4}^+\text{CD45RC}^{\text{neg}}$  T-Lymphozyten, die aus Lebertransplantaten und Milzen an Tag 3 und Tag 30 nach Transplantation isoliert wurden. Dargestellt ist das Verhältnis der im ELISA gemessenen Optischen Dichten:  $\text{OD}_{(\text{Zytokin})} / \text{OD}_{(\text{GAPDH})}$ . Je größer das Verhältnis, desto stärker die Expression des betreffenden Zytokins. (A, B):  $\text{INF-}\gamma$ ; (C, D):  $\text{TNF-}\alpha$ ; (E, F):  $\text{IL-10}$ ; (G, H):  $\text{IL-13}$ .

■  $\text{CD4}^+\text{CD45RC}^{\text{pos}}$     ■  $\text{CD4}^+\text{CD45RC}^{\text{neg}}$

### 4.3 Phänotypisierung von Leber- und Milzleukozyten

Die in Kapitel 4.1.1 beschriebene Auswertung über die intrahepatischen T-Lymphozyten lassen den Schluss zu, dass in allogenen Lebertransplantaten eine aktive Immunantwort stattfindet. Vermutlich sind hieran aktivierte  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten beteiligt, deren Anteil nach Transplantation auf das Drei- bis Vierfache der nicht aktivierten  $CD4^+CD45RC^{pos}$  T-Lymphozyten anstieg. Um ein umfassendes Bild der unterschiedlichen „Phänotypen“ innerhalb der intrahepatischen Leukozyten zu erhalten, wurden sie intensiv durchflusszytometrisch analysiert und mit den „Phänotypen“ der Milzleukozyten verglichen. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die phänotypischen Charakteristika aktivierter und nicht aktivierter  $CD4^+$  T-Lymphozyten gelegt.

#### 4.3.1 Intrahepatische Leukozyten nicht-transplantierte Lebern

In einem ersten Schritt wurde die intrahepatische Leukozytenpopulation nicht-transplantierte Lebern untersucht. Wie aus Tab. 4.3 zu entnehmen ist, dominieren Makrophagen mit 42 Prozent, Natürliche Killerzellen mit 38 Prozent und T-Lymphozyten mit 23 Prozent die Leukozytenpopulation. Dabei unterschieden sich die intrahepatischen Leukozyten aus LEW- und DA-Lebern nicht wesentlich. In nicht-transplantierten Lebern sind sowohl  $CD4^+CD45RC^{pos}$  als auch  $CD4^+CD45RC^{neg}$  zu finden. Dies trifft auch für die T-Zellpopulation der Milz zu. Die intrahepatischen  $CD4^+$  T-Lymphozyten waren in  $W3/25^{hochpos}Ox-22^{neg}$  und  $W3/25^{hochpos}Ox-22^{hochpos}$  zu unterteilen. Diese Zellen werden in Abschnitt 4.3.2 beschrieben.

Tab. 4.3: Durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten aus Lebern und Milzen nicht-transplantiert DA- und LEW-Ratten. Dargestellt sind die prozentuale Verteilung der Leukozyten-Subpopulationen (Fett) sowie die verwendeten Antikörperkombinationen (Kursiv). Mittelwert und Standardabweichung wurden von jeweils fünf Messungen errechnet. Für jede Messung wurden die Leukozyten aus je einem Organ isoliert. Die Prozentangaben beziehen sich auf die in R1 befindlichen Zellen. Die graphischen Darstellungen in Form von Kontur-Diagrammen sind im Anhang (A.3) aufgeführt.

Zellpopulation	DA-Leber	LEW-Leber	DA-Milz
<b>MHC-I</b> <i>Ox-18<sup>pos</sup></i>	82,4 ± 0,8	86,6 ± 0,8	78,6 ± 0,9
<b>T-Lymphozyten</b> <i>R73<sup>pos</sup></i>	23,4 ± 5,6	25,3 ± 1,2	43,6 ± 2,8
<b>CD4<sup>+</sup></b> <i>R73<sup>pos</sup> W3/25<sup>pos</sup></i>	15,1 ± 4,0	16,6 ± 1,1	35,1 ± 1,9
<b>CD45RC</b> <i>W3/25<sup>pos</sup> Ox-22<sup>neg</sup></i> <i>W3/25<sup>hochpos</sup> Ox-22<sup>neg</sup></i>	6,9 ± 1,5	10,3 ± 0,4	13,0 ± 0,6
<i>W3/25<sup>pos</sup> Ox-22<sup>pos</sup></i> <i>W3/25<sup>hochpos</sup> Ox-22<sup>hochpos</sup></i>	8,6 ± 2,3 4,1 ± 0,7	10,9 ± 3,0 -----	20,5 ± 1,0 -----
<b>CD90</b> <i>W3/25<sup>pos</sup> Ox-7<sup>pos</sup></i> <i>W3/25<sup>hochpos</sup> Ox-7<sup>pos</sup></i>	4,8 ± 1,0 4,1 ± 0,9	6,5 ± 2,3 -----	4,5 ± 0,4 -----
<b>CD25</b> <i>W3/25<sup>pos</sup> Ox-39<sup>pos</sup></i>	2,3 ± 0,2	3,5 ± 0,6	3,2 ± 0,3
<b>T-Zell Blasten</b> <i>W3/25<sup>pos</sup> FSC<sup>pos</sup></i>	4,0 ± 1,3	5,9 ± 0,8	2,3 ± 0,5
<b>CD8<sup>+</sup></b> <i>R73<sup>pos</sup> Ox-8<sup>pos</sup></i>	8,0 ± 0,9	9,9 ± 1,5	9,2 ± 1,2
<b>Natürliche Killerzellen</b> <i>Ox-8<sup>pos</sup> 10/78<sup>pos</sup></i>	38,9 ± 0,8	25,1 ± 3,4	3,2 ± 0,5
<b>Makrophagen</b> <i>Ox-42<sup>pos</sup></i> <i>Ox-42<sup>pos</sup> Ox-6<sup>pos</sup> (MHC-II)</i> <i>Ox-42<sup>pos</sup> W325<sup>pos</sup></i> <i>ED2</i>	42,3 ± 6,3 11,2 ± 1,7 15,2 ± 2,9 12,0 ± 2,3	45,5 ± 1,7 7,7 ± 0,9 21,4 ± 1,4 9,0 ± 0,8	28,6 ± 8,4 17,3 ± 1,2 6,9 ± 0,8 21,8 ± 0,2
<b>MHC-II</b> <i>Ox-6<sup>pos</sup></i>	21,5 ± 7,1	21,8 ± 6,5	46,2 ± 0,8
<b>B-Lymphozyten</b> <i>Ox-33<sup>pos</sup> Ox-6<sup>pos</sup></i>	9,2 ± 0,7	15,4 ± 3,6	29,9 ± 1,0

### 4.3.2 Intrahepatische Leukozyten allogener Lebertransplantate

Unmittelbar nach Lebertransplantation kam es zu einem Austausch der spenderspezifischen intrahepatischen Leukozyten gegen empfängerspezifische Leukozyten. Die ursprünglich, zum Zeitpunkt der Transplantation in LEW-Lebern befindlichen Leukozyten (MHC-Haplotyp: RT1<sup>l</sup>), wurden von Leukozyten des DA-Empfängers (MHC-Haplotyp: RT1<sup>avl</sup>) ersetzt (Anhang Abb. 10.2).

Die durchflusszytometrischen Analysen der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zeigten, dass diese nicht nur in CD45RC<sup>pos</sup> und CD45RC<sup>neg</sup> Zellen zu unterscheiden waren, sondern dass es auch CD4<sup>hochpos</sup>, CD45RC<sup>hochpos</sup> T-Lymphozyten gab, die sowohl CD4 als auch CD45RC verstärkt exprimierten; d.h. diese Zellen waren für beide Moleküle hochpositiv (Abb. 4.4).

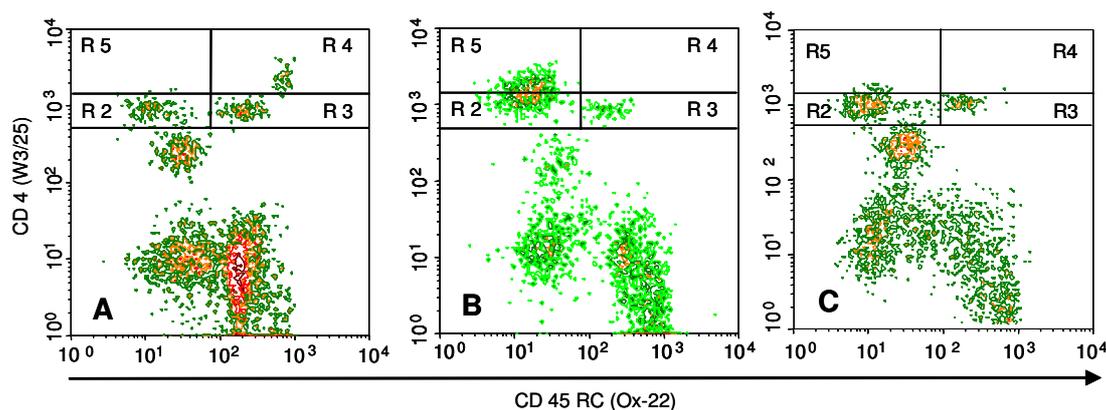


Abb. 4.4: Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit den monoklonalen Antikörpern W3/25 und Ox-22. Folgende Subpopulationen lassen sich unterscheiden: R2 = W3/25<sup>pos</sup>Ox-22<sup>neg</sup>, R3 = W3/25<sup>pos</sup>Ox-22<sup>pos</sup>, R4 = W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>hochpos</sup>, R5 = W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>neg</sup>. Auch in Größe und Granularität unterscheiden sich die einzelnen Zellpopulationen (Abb. 4.5). In Milzen konnten weder W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>hochpos</sup> noch W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>neg</sup> nachgewiesen werden. A = Kontrollgruppe, Leukozyten nicht-transplanterter DA-Lebern, B-C = intrahepatische Leukozyten nach Lebertransplantation im spontan-toleranten Tiermodell, B = 3 Tage p.op., C = 30 Tage p.op.

Tab. 4.4: Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit den monoklonalen Antikörpern W3/25 und Ox-22. Ergänzend zur Abb. 4.4 sind hier die Zählereignisse der unterschiedlichen Regionen bei jeweils 10.000 gezählten Ereignissen dargestellt. Ko = Kontrollgruppe; R2 und R3: s. Abb. 4.4. R4 = W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>hochpos</sup> Zellpopulation zeigt sich nur in nicht-transplantierten DA-Lebern. R5 = Die W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>neg</sup> Lymphozyten konnten nur in spontantoleranten LEW-Lebern an Tag 3 p.op. nachgewiesen werden.

	W3/25 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>neg</sup> (R2)	W3/25 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>pos</sup> (R3)	W3/25 <sup>hochpos</sup> Ox-22 <sup>hochpos</sup> (R4) W3/25 <sup>hochpos</sup> Ox-22 <sup>neg</sup> (R5)
<b>Ko</b>	335	418	202 (R4)
<b>Tag 3</b>	441	253	750 (R5)

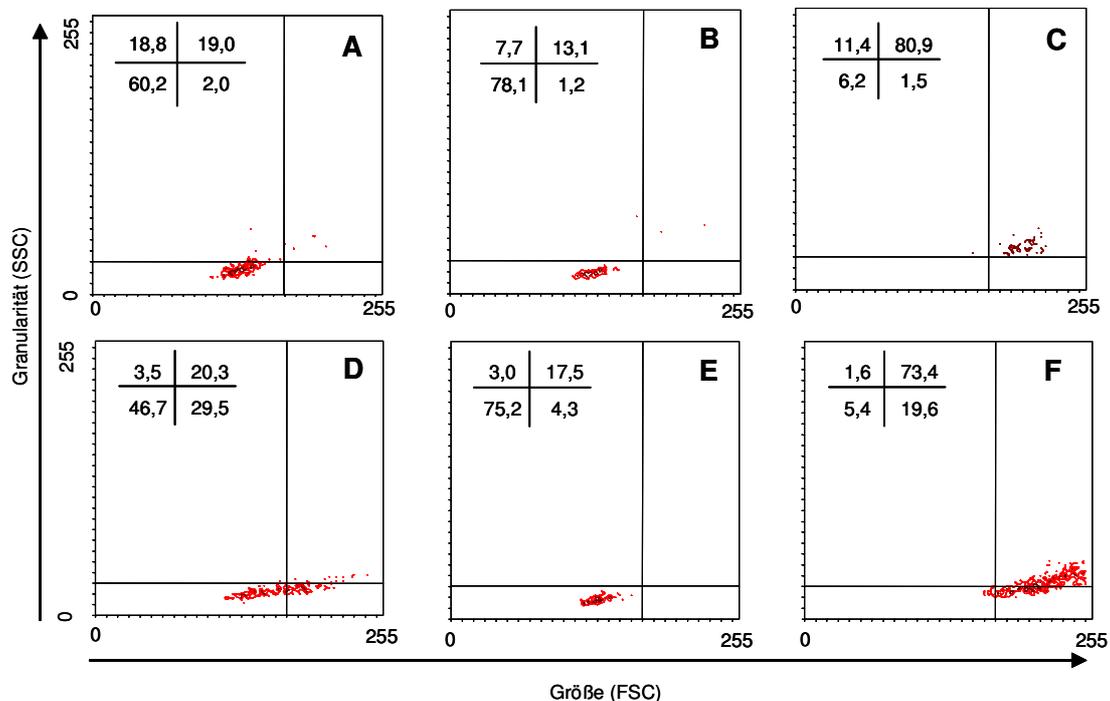


Abb. 4.5: Durchflusszytometrische Analysen zur Größe und Granularität der CD4<sup>+</sup>CD45RC Subpopulationen. Die Daten zeigen, dass die vier Subpopulationen der CD4<sup>+</sup>CD45RC T-Lymphozyten sich nicht nur in der Stärke der Expression von CD4 und CD45RC unterscheiden (Abb. 4.4), sondern auch in ihrer Zellgröße. A-C: intrahepatische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nicht transplantiert DA-Lebern, A = W3/25<sup>pos</sup>Ox-22<sup>neg</sup>, B = W3/25<sup>pos</sup>Ox-22<sup>pos</sup>, C = W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>hochpos</sup>, D-F: intrahepatische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten 3 Tage p.op. aus spontantoleranten Lebertransplantaten, D = W3/25<sup>pos</sup>Ox-22<sup>neg</sup>, E = W3/25<sup>pos</sup>Ox-22<sup>pos</sup>, F = W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>neg</sup>. Zahlenwerte = Prozent der in der jeweiligen Region gemessenen Ereignisse.

Tab. 4.5: Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer Leukozyten spontantoleranter Lebertransplantate 3 und 30 Tage nach Transplantation. Dargestellt sind die prozentuale Verteilung der Leukozyten-Subpopulationen (Fett) sowie die verwendeten Antikörperkombinationen (Kursiv). Mittelwert und Standardabweichung wurden von jeweils fünf Messungen errechnet. Für jede Messung wurden die Leukozyten aus je einem Organ isoliert. Die Verteilung der einzelnen Leukozytenpopulationen am Tag 100 entsprach der von nicht-transplantierten Lebern (Tab. 10.3). Die durchflusszytometrischen Auswertungen sind im Anhang (A.3) dargestellt. Die Prozentangaben beziehen sich auf die in R1 befindlichen Zellen. Ko = Kontrolle: T-Lymphozyten, die aus nicht-transplantierten DA-Lebern isoliert wurden.

Intrahepatische Leukozyten	Ko	Tag 3	Tag 30
<b>MHC-I</b> <i>Ox-18<sup>pos</sup></i>	82,4 ± 0,8	82,0 ± 1,9	78,9 ± 3,8
<b>T-Lymphozyten</b> <i>R73<sup>pos</sup></i>	23,4 ± 5,6	46,1 ± 4,8	37,9 ± 5,2
<b>CD4<sup>+</sup></b> <i>R73<sup>pos</sup> W3/25<sup>pos</sup></i>	15,1 ± 4,0	29,6 ± 3,9	17,5 ± 1,8
<b>CD45RC</b> <i>W3/25<sup>pos</sup> Ox-22<sup>neg</sup></i>	6,9 ± 1,5	8,0 ± 1,0	11,1 ± 0,9
<i>W3/25<sup>hochpos</sup> Ox-22<sup>neg</sup></i>	-----	13,6 ± 0,9	-----
<i>W3/25<sup>pos</sup> Ox-22<sup>pos</sup></i>	8,6 ± 2,3	4,6 ± 0,5	7,1 ± 1,9
<i>W3/25<sup>hochpos</sup> Ox-22<sup>hochpos</sup></i>	4,1 ± 0,7	-----	-----
<b>CD90</b> <i>W3/25<sup>pos</sup> Ox-7<sup>pos</sup></i>	4,8 ± 1,0	2,9 ± 0,8	2,2 ± 0,4
<i>W3/25<sup>hochpos</sup> Ox-7<sup>pos</sup></i>	4,1 ± 0,9	-----	-----
<b>CD25</b> <i>W3/25<sup>pos</sup> Ox-39<sup>pos</sup></i>	2,3 ± 0,2	13,7 ± 1,6	2,6 ± 0,7
<b>T-Zell Blasten</b> <i>W3/25<sup>pos</sup> FSC<sup>pos</sup></i>	4,0 ± 1,3	17,5 ± 4,4	3,5 ± 0,7
<b>CD8<sup>+</sup></b> <i>R73<sup>pos</sup> Ox-8<sup>pos</sup></i>	8,0 ± 0,9	18,6 ± 7,4	19,2 ± 6,9
<b>Natürliche Killerzellen</b> <i>Ox-8<sup>pos</sup> 10-78<sup>pos</sup></i>	38,9 ± 0,8	5,9 ± 0,2	13,3 ± 1,2
<b>Makrophagen</b> <i>Ox-42<sup>pos</sup></i>	42,3 ± 6,3	31,6 ± 5,8	18,8 ± 7,1
<i>Ox-42<sup>pos</sup> Ox-6<sup>pos</sup> (MHC-II)</i>	11,2 ± 1,7	7,3 ± 0,7	3,8 ± 1,8
<i>Ox-42<sup>pos</sup> W325<sup>pos</sup></i>	15,2 ± 2,9	6,2 ± 1,0	10,1 ± 3,7
<i>ED2</i>	12,0 ± 2,3	25,6 ± 3,6	7,8 ± 2,8
<b>MHC-II</b> <i>Ox-6<sup>pos</sup></i>	21,5 ± 7,1	20,3 ± 1,4	16,5 ± 4,2
<b>B-Lymphozyten</b> <i>Ox-33<sup>pos</sup> Ox-6<sup>pos</sup></i>	9,2 ± 0,7	12,4 ± 0,9	9,2 ± 0,7

In der Frühphase nach Lebertransplantation stieg der Anteil aktivierter T-Lymphozyten, hierbei handelt es sich um die  $CD4^+CD45RC^{neg}$  und  $CD4^{hochpos}CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten, um das Dreifache auf über 21 Prozent (Tab. 4.5). Dabei wurden die  $CD4^{hochpos}CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten mit 13,6 Prozent nur zu diesem Zeitpunkt und ausschließlich im Lebertransplantat nachgewiesen. Im Vorwärts-Seitwärts Streulicht waren über 90 Prozent dieser Zellen große Lymphozyten ( $FSC^{pos}$ ). Hierin unterschieden sie sich deutlich von den  $CD4^{pos}CD45RC^{neg}$  (Abb. 4.5). In der Spätphase nach Transplantation (Tag 30) konnten die  $CD4^{hochpos}$  T-Lymphozyten nicht nachgewiesen werden, doch dominierten die aktivierten  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten auch zu diesem Zeitpunkt die intrahepatische Zellpopulation (Tab. 4.5).

Die in Tab. 4.5 aufgeführten Daten zu den T-Lymphozyten lassen interessante Schlüsse zu: So steigt der Anteil aktivierter ( $CD25^{pos}$ )  $CD4^+$  T-Lymphozyten am Tag 3 auf das nahezu 14-fache an. Da auch der Anteil der  $W3/25^{hochpos}Ox-22^{neg}$  sowie der  $W3/25^{pos}Ox-22^{neg}$  Zellen zunimmt, ist anzunehmen, dass sie ebenfalls  $CD25^{pos}$  sind. Beide Marker sind auf aktivierten T-Lymphozyten zu finden. Inwieweit es sich bei den  $W3/25^{hochpos}Ox-22^{neg}$  sowie den  $W3/25^{pos}Ox-22^{neg}$  Zellen um unterschiedliche Subpopulationen oder um unterschiedlich stark aktivierte T-Lymphozyten handelt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht entschieden werden. Auffallend ist, dass die  $W3/25^{hochpos}Ox-22^{neg}$  T-Lymphozyten an Tag 30 nicht mehr in den Lebertransplantaten zu finden waren. Da zu diesem Zeitpunkt die Immunantwort weitestgehend beendet war, könnte es sich bei den  $W3/25^{hochpos}Ox-22^{neg}$  T-Lymphozyten um die Zellen handeln, die durch die allogene Immunantwort aktiviert wurden. Tab. 4.6 zeigt nochmals die zellulären Veränderungen der  $CD4^+$  T-Lymphozyten nach *in vivo* Aktivierung durch Lebertransplantation.

Tab. 4.6: Aktivierungsparameter intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten: Die Stärke der Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wird durch das Verhältnis von aktivierten Ox-22<sup>neg</sup> zu nicht aktivierten Ox-22<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten verdeutlicht. Die zusätzlichen Parameter IL-2 Rezeptor Expression und die Zunahme an T-Zell Blasten bestätigen die *in vivo* Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch Lebertransplantation. Angaben bezüglich IL-2R und T-Zell Blasten sind prozentuale Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (W3/25<sup>pos</sup>). Ko = Kontrolle: T-Lymphozyten, die aus nicht-transplantierten DA-Lebern isoliert wurden.

CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	Ko	Nach Transplantation		
		Tag 3	Tag 30	Tag 100
<b>CD45RC<sup>neg</sup> / CD45RC<sup>pos</sup></b> Ox-22 <sup>neg</sup> / Ox-22 <sup>pos</sup>	0,5 / 1	4,7 / 1	1,6 / 1	0,9 / 1
<b>IL-2R<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen</b> Ox-39 <sup>pos</sup>	16,3 ± 3,2	46,8 ± 3,8	17,1 ± 5,8	20,0 ± 6,0
<b>T-Zell Blasten</b> FSC <sup>pos</sup>	22,8 ± 5,6	60,9 ± 11,1	19,5 ± 3,1	30,1 ± 5,3

Eine weitere T-Zell Subpopulation, die ausschließlich in nicht-transplantierten Lebern zu finden war, sind die W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>hochpos</sup> Zellen. Hierbei scheint es sich möglicherweise um naive T-Lymphozyten zu handeln (Tab. 4.5, Abb. 4.4). Diese Vermutung wird bestärkt, wenn man sich die Verteilung von CD90-positiven Zellen anschaut. CD90 wird von naiven T-Lymphozyten exprimiert und nahezu die Hälfte der intrahepatischen CD4<sup>+</sup>CD90<sup>pos</sup> T-Lymphozyten aus nicht-transplantierten DA-Lebern war W3/25<sup>hochpos</sup>. Diese Zellpopulation verschwand nach *in vivo* Aktivierung und zeigte sich erst wieder am Tag 100 nach Transplantation (Tab. 4.5, A.3).

#### *Zusammenfassung zur phänotypischen Charakterisierung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten*

Die durchflusszytometrischen Analysen intrahepatischer Leukozyten aus LEW- und DA-Ratten zeigen, dass die Leber das gesamte Leukozytenspektrum eines lymphatischen Organs (hier im Vergleich zur Milz) aufweist. Jedoch sind die verschiedenen Subpopulationen zu unterschiedlichen Anteilen vertreten. In

nicht-transplantierten Lebern sind Makrophagen und NK-Zellen vorherrschend, während in Milzen die T- und B-Lymphozyten wesentlich stärker vertreten sind (Tab. 4.3). Nach *in vivo* Aktivierung durch Lebertransplantation nahm vor allem der Anteil intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten stark zu (Tab. 4.5). Die detaillierte Analyse dieser Zellpopulation anhand der Oberflächenmoleküle CD4 und CD45RC (Abb. 4.4) sowie nach Größe und Granularität (Abb. 4.5) lässt eine Unterteilung in vier Subpopulationen zu: W3/25<sup>pos</sup>Ox-22<sup>neg</sup>, W3/25<sup>pos</sup>Ox-22<sup>pos</sup>, W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>hochpos</sup> und die W3/25<sup>hochpos</sup>Ox-22<sup>neg</sup>.

### 4.3.3 Intrahepatische Leukozyten nach *in vitro* Aktivierung

Im vorangehenden Abschnitt wurden intrahepatische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nicht-transplantierten Lebern und spontantoleranter Lebertransplantate untersucht. Im Folgenden wird analysiert, wie sich ihr Phänotyp unter *in vitro* Stimulation ändert. Dazu wurden die Lymphozyten mit den monoklonalen Antikörpern R73 und JJ319 konjugiert und über einen Zeitraum von 16 Stunden *in vitro* stimuliert (Abschnitt 3.5).

Die Analysen der aus nicht-transplantierten DA-Lebern isolierten Leukozyten zeigten, dass der prozentuale Anteil an CD45-positiven Zellen und ihre Vitalität nahezu identisch blieb (Tab. 4.7).

Tab. 4.7 Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer Leukozyten aus nicht-transplantierten DA-Lebern unmittelbar nach Isolierung sowie nach 3 bzw. 16 stündiger Inkubation mit und ohne Stimulation mit monoklonalen Antikörpern. CD45 (Ox-1): prozentualer Anteil CD45<sup>pos</sup> Zellen an R1. 7-AAD<sup>neg</sup> (7-Amino-Actinomycin D): prozentualer Anteil vitaler Zellen an R1. Alle Angaben sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils mindestens drei Versuchen.

Naive intrahepatische Leukozyten					
	Frisch isoliert		Inkubation <i>in vitro</i>		
	Zum Zeitpunkt der Isolierung	Nicht-Stimuliert 3 Stunden	Stimuliert 3 Stunden	Nicht-Stimuliert 16 Stunden	Stimuliert 16 Stunden
<b>CD45 (Ox-1)</b>	91,3 ± 10,1	96,6 ± 2,7	97,0 ± 0,2	97,3 ± 1,6	96,8 ± 0,8
<b>7-AAD<sup>neg</sup></b>	96,4 ± 3,4	98,1 ± 1,7	98,7 ± 1,0	97,9 ± 1,4	97,1 ± 1,3

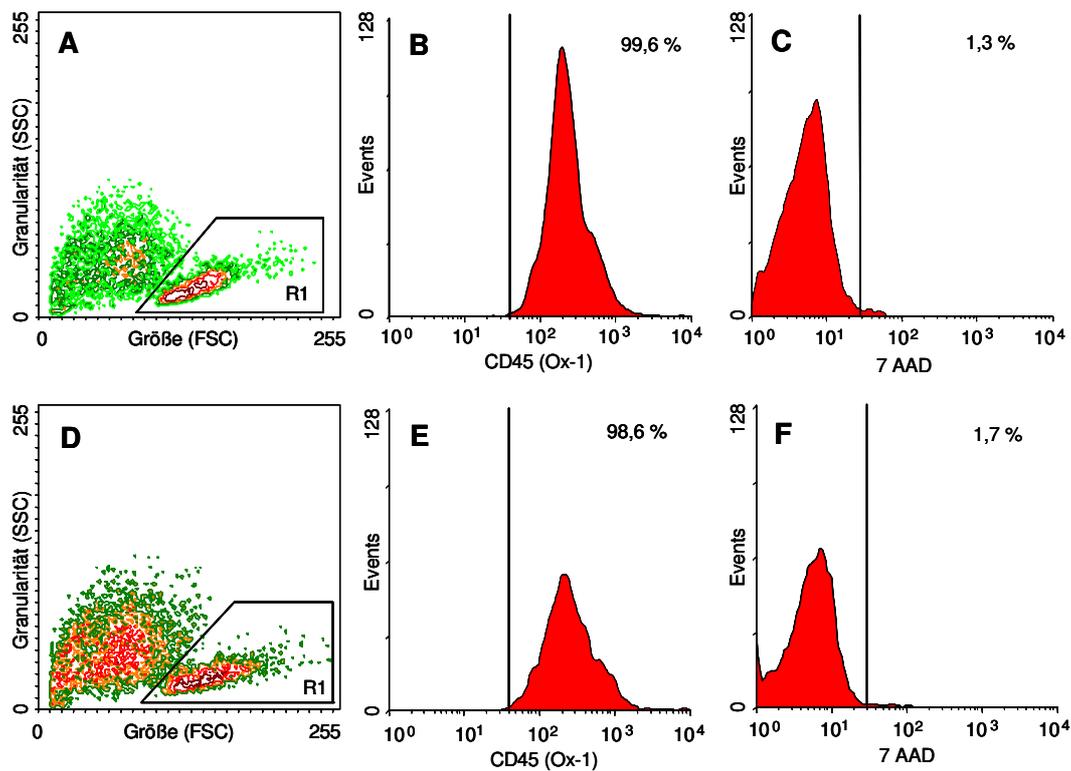


Abb. 4.6 Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer Leukozyten aus nicht-transplantierten DA-Lebern nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden. A-C: Leukozyten wurden ausschließlich in RPMI 1640 inkubiert; D-E: Leukozyten wurden vor Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern R73 und JJ319 stimuliert. Region 1 (R1) = Leukozytenregion, Zahlenwerte in B, C, E und F sind prozentuale Anteile der Zählereignisse in der Leukozytenregion (Vergleiche auch Abb. 3.2.).

Während *in vivo* der Anteil aktivierter CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten stark zunahm (Tab. 4.5), kam es bei der Stimulierung *in vitro* überraschenderweise zu einer Zunahme der CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten. Dass jedoch eine Aktivierung innerhalb von 16 Stunden stattgefunden hat, belegt der 6-fache Anstieg IL-2 Rezeptor-positiver T-Lymphozyten (Tab. 4.8). Hingegen kam es bei der Aktivierung *in vivo* nur zu einem 3-fachen Anstieg (Tab. 4.5, Tab. 4.6).

Tab. 4.8: Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus nicht-transplantierten DA-Lebern vor und nach *in vitro* Stimulierung mit den monoklonalen Antikörpern R73 und JJ319 für 16 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Verteilung der einzelnen Parameter der W3/25<sup>pos</sup> Populationen von jeweils drei Isolierungen.

Naive CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten der Leber					
	Frisch isoliert		Inkubation <i>in vitro</i>		
	Zum Zeitpunkt der Isolierung	Nicht-Stimuliert 16 Stunden	Stimuliert 3 Stunden	Stimuliert 8 Stunden	Stimuliert 16 Stunden
<b>CD45RC</b> <i>Ox-22<sup>pos</sup></i>	61,2 ± 3,9	60,5 ± 1,0	81,1 ± 3,8	80,9 ± 2,2	89,3 ± 2,3
<b>CD25</b> <i>Ox-39<sup>pos</sup></i>	16,3 ± 3,2	13,1 ± 1,2	75,4 ± 4,9	73,3 ± 4,2	87,4 ± 8,2
<b>Blasten</b> <i>FSC<sup>pos</sup></i>	19,5 ± 4,0	7,9 ± 2,5	15,2 ± 4,0	14,3 ± 3,6	18,1 ± 2,8

Tab. 4.8 zeigt auch, dass die Expressionstärke der Aktivierungsparameter schon innerhalb der ersten drei Stunden nach Stimulierung stark anstieg. Im weiteren Stimulationsverlauf kam es nur noch zu einem geringen Anstieg.

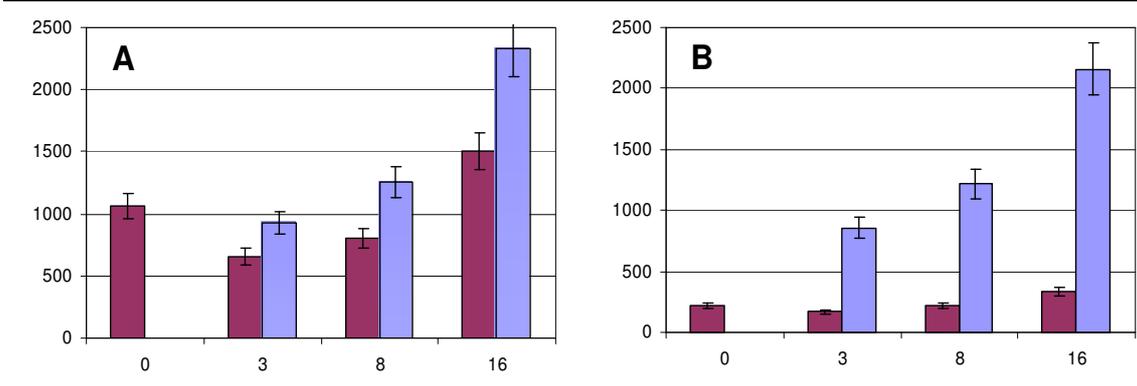


Abb. 4.7: Vergleich aktivierter und nicht aktivierter intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nicht-transplantierten DA-Lebern über einen Zeitraum von 16 Stunden. A = CD45RC<sup>pos</sup>, B = IL-2R<sup>pos</sup>. X-Achse = Inkubationsdauer in Stunden, Stunde 0 = frisch isolierte Zellen; Y-Achse = absolute Zählereignisse. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils mindestens drei Messungen.

■ Keine Stimulation      ■ Stimulation

Die Stärke der Expression von CD45RC und IL-2R auf CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten ist in Abb. 4.8 graphisch dargestellt.

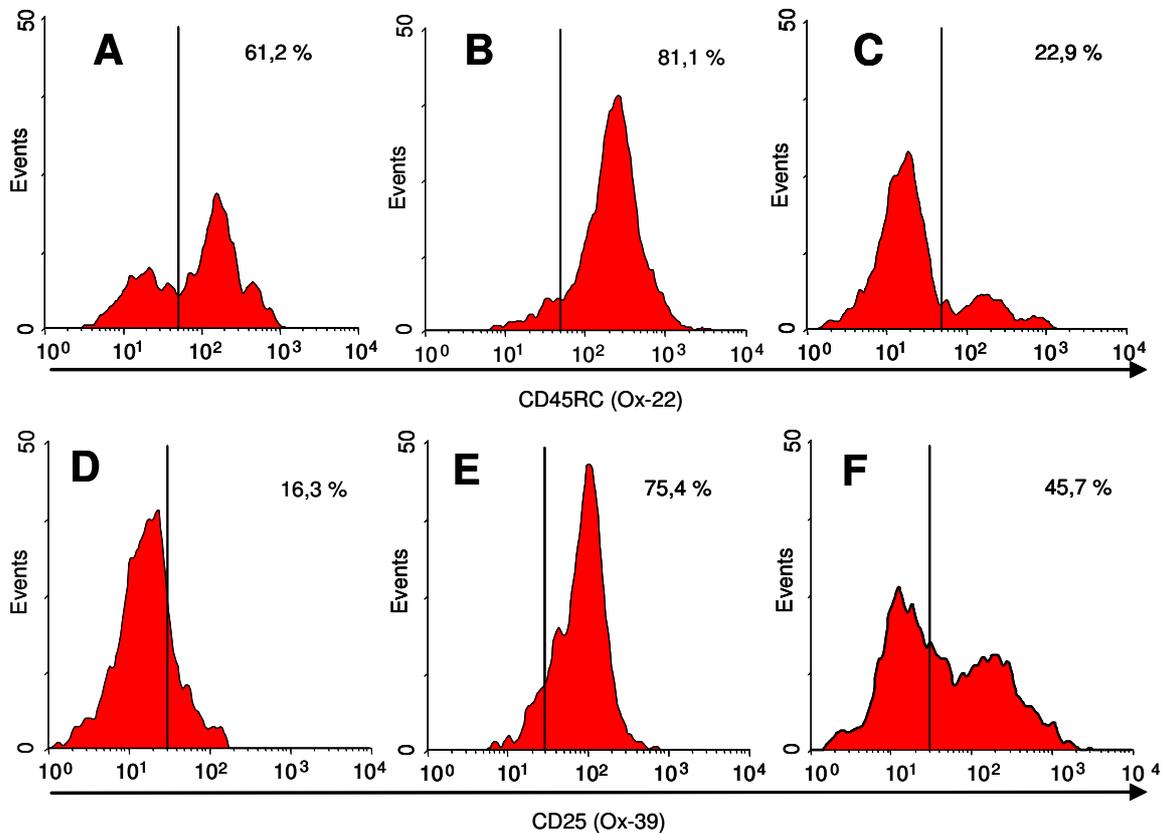


Abb. 4.8: Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten: Untersucht wurden die Expression von CD45RC und IL-2R (CD25) auf W3/25<sup>pos</sup> T-Lymphozyten nicht-transplantierte DA-Lebern (A u. D), die zudem für drei Stunden *in vitro* stimuliert wurden (B, E). Zum Vergleich die Expression von CD45RC und IL-2R auf *in vivo* aktivierten intrahepatischen W3/25<sup>pos</sup> T-Lymphozyten spontantoleranter Lebertransplantate 3 Tage nach Transplantation C u. F). Die Prozentzahlen geben den Anteil der CD45RC<sup>pos</sup> bzw. CD25<sup>pos</sup> an den W3/25<sup>pos</sup> T-Lymphozyten an (siehe auch Abb. 10.10 und Abb. 10.11).

Die hier beschriebenen Veränderungen naiver intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach *in vitro* Stimulation zeigen sich im Wesentlichen auch bei bereits *in vivo* aktivierten Lymphozyten aus transplantierten LEW-Lebern der TOL-Gruppe (Tab. 10.8) sowie bei Milzleukozyten transplantierte und nicht-transplantierte DA-Ratten (Tab. 10.9 und Tab. 10.10).

## 5 Beantwortung der Fragen

1. Unterscheiden sich intrahepatische Leukozyten und Milz-Leukozyten hinsichtlich ihres Phänotyps? Lassen sich qualitative und quantitative Unterschiede feststellen?

Leber und Milzen weisen das gleiche Spektrum an Leukozyten auf, auch wenn der prozentuale Anteil der einzelnen Subpopulationen verschieden ist. In nicht-transplantierten Lebern dominieren Makrophagen und Natürliche Killerzellen. Nach Lebertransplantation steigt der Anteil aktivierter T-Lymphozyten rasch an. Die naiven  $CD4^+CD45RC^{pos}$  T-Lymphozyten verringern sich, während der Anteil aktivierter  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten sich erhöht.

2. Welche Zytokine werden von aufgereinigten  $CD4^+CD45RC^{pos}$  sezerniert und welche von  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten?

Sowohl die  $CD4^+CD45RC^{pos}$  wie auch die  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten waren nach ihrer Aufreinigung *in vitro* zu stimulieren. Für die sezernierten Zytokine INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-13 waren keine Unterschiede zwischen den beiden Subpopulationen nachzuweisen. Anders sieht es aus, wenn man die Ergebnisse der kombinierten RT-PCR/ELISA-Methode betrachtet. So sind es die  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten, die stärker die Th2-Zytokine IL-10 und IL-13 exprimieren, während die  $CD4^+CD45RC^{pos}$  T-Lymphozyten stärker die Th1-Zytokine INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  exprimieren. Auch gibt es Unterschiede in der Expression von Th2-Zytokinen zwischen  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten aus Lebertransplantaten und Milzen.

3. Lässt sich durch die kombinierte Analyse von Oberflächenmolekülen und Zytokinen eine Population von T-Lymphozyten mit immunmodulatorischer Funktion identifizieren?

Die Zytokinanalysen zeigen, dass weder  $CD4^+ CD45RC^{pos}$  noch  $CD4^+ CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten ein spezifisches Muster aufwiesen. IL-13 wurde zwar in der Spätphase nach Transplantation häufiger von  $CD4^+ CD45RC^{neg}$  als von  $CD4^+ CD45RC^{pos}$  T-Lymphozyten produziert, jedoch konnte in einigen Versuchen auch eine vergleichbare Produktion an IL-13 von den  $CD45RC^{pos}$  T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Zwar wurde die Zytokinexpression an aufgereinigten  $CD4^+ CD45RC^{pos}$  und  $CD4^+ CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten durchgeführt, doch deuten zahlreiche Daten aus der Literatur darauf hin, dass beide Populationen nicht homogen sind. So kann es sich bei den  $CD4^+ CD45RC^{pos}$  T-Lymphozyten sowohl um naive T-Lymphozyten (vermutlich  $CD4^{hochpos} CD45RC^{hochpos}$ ) als auch um ruhende Gedächtniszellen (vermutlich  $CD4^{pos} CD45RC^{pos}$ ) handeln. Die  $CD4^+ CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten lassen sich in aktivierte T-Lymphozyten (vermutlich  $CD4^{hochpos} CD45RC^{neg}$ ) und in so genannte aktivierte Gedächtniszellen (vermutlich  $CD4^{pos} CD45RC^{neg}$ ) unterteilen. Diese Heterogenität der beiden Hauptpopulationen – den  $CD4^+ CD45RC^{pos}$  und  $CD4^+ CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten – könnte das nicht eindeutige Zytokinprofil erklären.

4. Unterscheiden sich *in vivo* aktivierte  $CD4^+$  T-Lymphozyten von *in vitro* stimulierten  $CD4^+$  T-Lymphozyten?

*In vivo* aktivierte  $CD4^+$  T-Lymphozyten wurden an Tag 3 und Tag 30 nach Lebertransplantation untersucht. Dabei wurden an Tag 3  $CD4^{hochpos} CD45RC^{neg}$  und somit mit großer Wahrscheinlichkeit aktivierte T-Lymphozyten nachgewiesen. An Tag 30 waren diese Zellen vollständig verschwunden. Dagegen waren an Tag 30 ein erhöhter Anteil an  $CD4^{pos} CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten, vermutlich aktivierte Gedächtniszellen, nachzuweisen. Ein vollständig anderes

Bild zeigte sich, wenn naive intrahepatische Leukozyten *in vitro* aktiviert wurden; unerwartet kam es zu einer starken Verringerung der  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten, der vermeintlich aktivierten T-Lymphozyten, und einem starken Anstieg der  $CD4^+CD45RC^{pos}$  T-Lymphozyten, den vermeintlich naive T-Lymphozyten, auf über 80 Prozent. Gegen diese Interpretation spricht, dass diese Zellen eindeutig den IL-2 Rezeptor exprimieren.

## 6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Phänomen der Lebertransplantat-Spontantoleranz. Die Induktion immunologischer Toleranz nach Organtransplantation bleibt weiterhin das ultimative Ziel der Transplantationsforschung. Zudem stellt immunologische Toleranz eines der interessantesten Themen innerhalb der Immunologie dar. Eine besondere Eigenschaft der Leber ist ihre Fähigkeit, unter bestimmten Bedingungen im Empfänger Toleranz gegenüber sich selbst zu induzieren. Die immunologischen Grundlagen dieses Phänomens sind trotz intensiver Forschung noch wenig bekannt.

Als Modell der Lebertransplantat-Spontantoleranz wurde in dieser Arbeit die Rattenstammkombination LEW-nach-DA gewählt. In dieser Stammkombination werden ausschließlich Lebertransplantate von DA-Empfängern spontan, d.h. ohne Immunsuppression, dauerhaft akzeptiert. In der umgekehrten Stammkombination DA-nach-LEW hingegen werden die Lebertransplantate akut abgestoßen (Abb. 1.2).

Verschiedene Mechanismen wie Mikrochimärismus, lösliche MHC Klasse-I Moleküle und Apoptose alloreaktiver T-Lymphozyten werden für das Phänomen der Lebertransplantat-Spontantoleranz verantwortlich gemacht (Kamada N et al., 1980; Starzl TE et al., 1993; Puppo F et al., 1995; Zavazava N, Krönke M, 1996; Geissler EK et al., 1998; Gassel HJ et al, 2001; Bishop GA et al., 2002). Zu diesen passiven immunologischen Mechanismen sind auch aktive immunologische Prozesse im Transplantat zu beobachten, die vermutlich auch im Wesentlichen zum Phänomen der Lebertransplantat-Spontantoleranz beitragen. Die Arbeitsgruppe um Ogawa z.B. wies eine bestimmte Subpopulation an intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in transplantierten Rattenlebern nach, die mit dem Zustand der Transplantatakzeptanz korrelierten. Ihr Phänotyp war CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> (Miyanari N et al., 1997). Solche T-Lymphozyten, die eine Immunreaktion eindämmen, anstatt sie zu

aktivieren, werden als Regulatorzellen oder tolerogene T-Lymphozyten bezeichnet. Sie sind sowohl in der Gruppe der CD45RC<sup>neg</sup> als auch der CD25<sup>pos</sup> T-Lymphozyten zu finden (Wood KJ, Sakaguchi S, 2003).

In dieser Arbeit wurden zur Klärung der zellulären intrahepatischen Vorgänge nach Lebertransplantation umfassende durchflusszytometrische Analysen naiver und *in vivo* aktivierter Leberleukozyten im Vergleich mit Milzleukozyten durchgeführt. Eine Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in naive und aktivierte T-Zellen sowie in ruhende und aktivierte Gedächtniszellen konnte mithilfe der Expression von CD45RC und IL-2R getroffen werden. Weiterhin wurden anhand des Zytokinmusters die intrahepatischen CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten funktionell differenziert.

## 6.1 Zelluläre Prozesse nach Lebertransplantation

Bishop et al. beschrieben, dass spenderspezifische Leukozyten nach Lebertransplantation in peripheren lymphatischen Geweben des Transplantat-Empfängers zu geringen Teilen gefunden werden. Dort kommt es – so Bishop – zu einer Aktivierung des Empfänger-Immunsystems und anschließend zu einer Infiltration des Lebertransplantates (Bishop et al., 2002). Da die Leber eine Vielzahl von „passenger Leukozyten“ enthält, die permanent zwischen zentralen und peripheren lymphatischen Organen zirkulieren, ist dies auch für den Zustand nach Lebertransplantation anzunehmen. Jedoch wurden in dieser Arbeit keine spenderspezifischen Leukozyten in der Milz nachgewiesen (A.1, Tab. 10.4). Auch zeigten sich in der Milz weder auf zellulärer, noch auf molekularer Ebene Anzeichen einer Aktivierung (Tab. 10.4). Dem gegenüber zeigten sich immunologische Prozesse im Lebertransplantat selbst, wie eine starke initiale Infiltration des Lebertransplantates durch empfängerspezifische Leukozyten (A.2, Abb. 10.1). Das Infiltrat wurde hauptsächlich von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten dominiert. Diese steuern den Ablauf der Immunantwort durch Rekrutierung und Aktivierung weiterer Zellgruppen, wie Makrophagen, CD8<sup>+</sup> T-

Lymphozyten, B-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (Walsh PT et al., 2004).

Eigene Analysen zeigen, dass es nach Lebertransplantation zu einem starken Anstieg der  $CD4^+CD45RC^{neg}$  T-Lymphozyten im Transplantat kommt (Kapitel 4.3.2, A.2). Betrachtet man das Verhältnis der  $CD45RC^{neg}$  zu den  $CD45RC^{pos}$   $CD4^+$  T-Lymphozyten, so zeigt sich, dass hier nicht eine statische Situation besteht, sondern vielmehr ein dynamischer Wechsel erfolgt. Während in nicht-transplantierten Lebern die nicht aktivierten ( $CD45RC^{pos}$ )  $CD4^+$  T-Lymphozyten doppelt so stark vertreten waren wie die aktivierten ( $CD45RC^{neg}$ ), überstiegen an Tag 3 und Tag 30 nach Lebertransplantation die aktivierten die nicht aktivierten in einem Verhältnis von 3:1 bzw. 4:1 (Kapitel 4.1.1, Abb. 10.3). Erst an Tag 100 nach Transplantation entsprach das Verhältnis der  $CD45RC^{neg}$  zu den  $CD45RC^{pos}$   $CD4^+$  T-Lymphozyten wieder dem einer nicht-transplantierten Leber (Tab. 3.1). Diese Daten zeigen, dass im Lebertransplantat selbst aktive immunologische Prozesse nicht nur in der Frühphase (Tag 3 p.op.), sondern auch in der Spätphase (Tag 30 p.op.) stattfinden. Zu welchem Zeitpunkt jedoch eine Entscheidung über Abstoßung und Toleranz getroffen wird, kann auch anhand der hier präsentierten Daten nicht entschieden werden.

## 6.2 Naive, aktivierte und Gedächtnis T- Lymphozyten

Entsprechend ihrer Funktion exprimieren T-Lymphozyten unterschiedliche Oberflächenmoleküle (Powrie F, Mason D, 1989 und 1990a; Spickett GP et al., 1983). Zur Differenzierung von naiven und aktivierten  $CD4^+$  T-Lymphozyten können die unterschiedlichen Isoformen des CD45R Moleküls herangezogen werden (Sarawar SR et al., 1993; Swain SL et al., 1996). Je nachdem, welche Gensequenzen dieses Moleküls exprimiert werden, entstehen die hochmolekularen Formen CD45RA (Mensch), CD45RB (Maus) oder CD45RC (Ratte) (Trowbridge I.S., Thomas M.L., 1994). Werden hingegen diese Gensequenzen aus dem Transkriptionsprodukt (mRNA) heraus gespalten, so entsteht die niedermolekulare Form  $CD45R^{neg}$ . Die hochmolekulare Form wird

von naiven, nicht aktivierten T-Lymphozyten exprimiert, wohingegen die niedermolekulare Form für aktivierte Zellen charakteristisch ist. Untersuchungen an beiden Populationen haben gezeigt, dass eine antigeninduzierte Reaktion am stärksten in der Gruppe der bereits aktivierten und somit „antigenerfahrenen“ CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten auftrat (Bell EB, 1992). Dies legte die Vermutung nahe, dass diese Zellpopulation Gedächtniszellen beinhaltet. Weitere Studien zeigten jedoch, dass vielmehr die CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten eine längere Überlebenszeit und einen verzögerten Rezirkulationszyklus zwischen peripheren und zentralen lymphatischen Gewebe aufwiesen (Michie CA et al., 1992; Tough DF, Sprent J, 1994; Sparshott SM, Bell EB, 1994). Bunce und Bell konnten 1997 zeigen, dass alle „antigenerfahrenen“ CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten nach Transfer in athymische Nahtmäuse und ohne Antigenstimulus wieder die hochmolekulare Form von CD45R exprimierten. Wurde jedoch in den Empfängertiere ein geringer Antigenstimulus aufrechterhalten, so verblieb ein Teil dieser Zellen im CD45RC<sup>neg</sup> Phänotyp, wohingegen der größere Anteil der Zellen den CD45RC<sup>pos</sup> Phänotyp aufwies. Dies lässt den Schluss zu, dass sich in beiden CD4<sup>+</sup> Populationen, den CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten Gedächtniszellen befinden.

Für diese Arbeit war das CD45RC Molekül zur Differenzierung von nicht aktivierten und aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Ratte von besonderem Interesse. Bei den durchflusszytometrischen Analysen zeigte sich, dass die intrahepatischen Leukozyten mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ox-22 nicht nur in CD45RC<sup>neg</sup> und CD45RC<sup>pos</sup> Lymphozyten unterteilt werden konnten, sondern, dass auch eine CD45RC<sup>hochpos</sup> Zellpopulation nachgewiesen wurde (Kapitel 4.3.1, Abb. 4.4). Auch bei Betrachtung der Expression von CD4 lässt sich nicht nur eine Unterteilung in negative und positive T-Lymphozyten treffen (Abb. 4.4, Abb. 10.6). Um die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenmoleküle genauer funktionell beschreiben zu können, wurden die Größe der Zellen und die Expressionsstärke von IL-2R und CD90 bestimmt. So konnte die in Tab. 6.1 gezeigte Differenzierung getroffen werden.

Tab. 6.1: Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Analysen intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Die prozentualen Anteile der jeweiligen Zellpopulation an der gesamten intrahepatischen Population zu den jeweiligen Zeitpunkten nach *in vivo* Aktivierung bzw. von naiven Leberleukozyten ist in Tab. 4.5 dargestellt. Die graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen ist den Querverweisen zu dieser Tabelle zu entnehmen.

<b>CD4<sup>hochpos</sup> CD45RC<sup>hochpos</sup> CD90<sup>pos</sup></b>	
FSC <sup>pos</sup> SSC <sup>pos</sup> W3/25 <sup>hochpos</sup> Ox-22 <sup>hochpos</sup> Ox-7 <sup>pos</sup>	Große, granulareiche Lymphozyten, die das CD4 Molekül und die hochmolekulare Variante des CD45R Moleküls in hoher Anzahl exprimieren. Des Weiteren exprimieren sie das CD90 Molekül. <b>→ Naive T-Lymphozyten</b> (Abb. 4.4 A, R4; Abb. 4.5 C; A.3, Abb. 10.9)
<b>CD4<sup>hochpos</sup> CD45RC<sup>neg</sup> IL-2R<sup>pos</sup></b>	
FSC <sup>pos</sup> SSC <sup>pos</sup> W3/25 <sup>hochpos</sup> Ox-22 <sup>neg</sup> Ox-39 <sup>pos</sup>	Große, granulareiche Lymphozyten, die das CD4 Molekül, sowie den IL-2 Rezeptor in hoher Anzahl und die niedermolekulare Variante des CD45R Moleküls exprimieren. <b>→ Aktivierte T-Lymphozyten</b> (Abb. 4.4 B, R5; Abb. 4.5 F)
<b>CD4<sup>pos</sup> CD45RC<sup>neg</sup></b>	
FSC <sup>neg</sup> SSC <sup>neg</sup> W3/25 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>neg</sup>	Lymphozyten die das CD4 Molekül und die niedermolekulare Variante von CD45R exprimieren und von denen 50 Prozent klein und granulaarm sind <b>→ Effektorzellen und möglicherweise aktivierte Gedächtniszellen</b> (Abb. 4.4 A + B + C, R2; Abb. 4.5 A + D)
<b>CD4<sup>pos</sup> CD45RC<sup>pos</sup></b>	
FSC <sup>neg</sup> SSC <sup>neg</sup> W3/25 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>pos</sup>	Kleine, granulaarme Lymphozyten, die das CD4 Molekül und die hochmolekulare Variante des CD45R exprimieren. <b>→ Naive T-Lymphozyten und möglicherweise ruhende Gedächtniszellen</b> (Abb. 4.4 A + B + C, R3; Abb. 4.5 B + E)

In Anlehnung an das von Bell EB et al. 1998 beschriebene Modell wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine Differenzierung zwischen aktivierten und ruhenden Gedächtniszellen und darüber hinaus zwischen naiven und aktivierten T-Lymphozyten anhand der monoklonalen Antikörper Ox-22 und W3/25 möglicherweise getroffen werden kann (Tab. 6.1., Abb. 6.1).

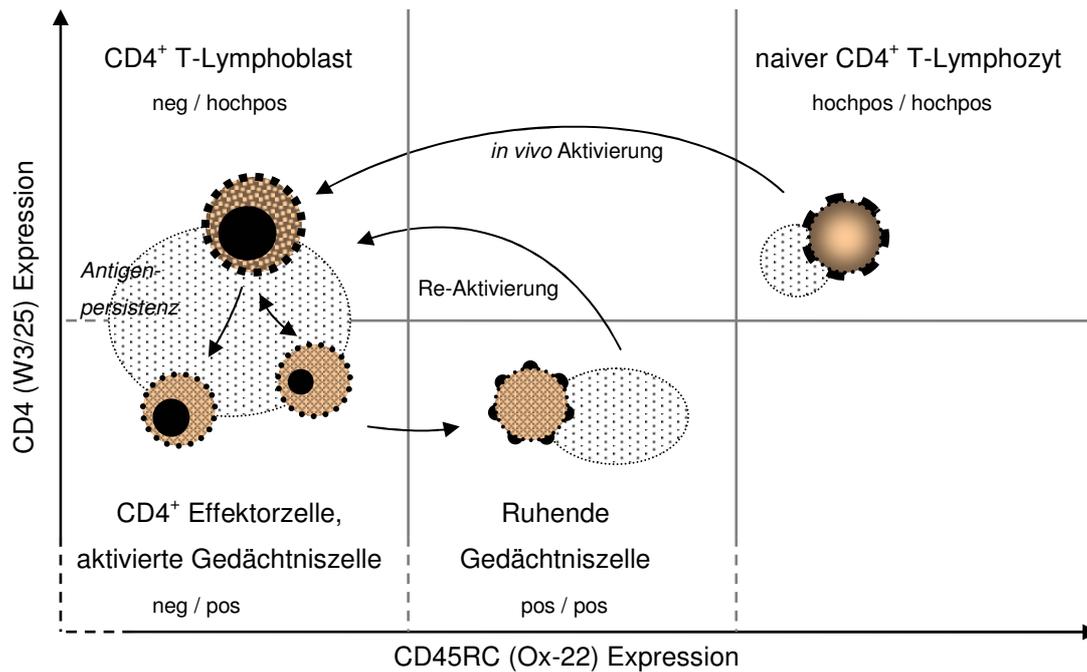


Abb. 6.1 Schematische Darstellung der in dieser Arbeit postulierten Populationen intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und ihr Phänotyp. Die grauen Kreise stellen die in dieser Arbeit durchflusszytometrisch analysierten intrahepatischen Zellpopulationen dar. Die CD4<sup>hochpos</sup>CD45RC<sup>hochpos</sup> T-Lymphozyten wurden nur in nicht-transplantierten Lebern und in der Spätphase (Tag 100) nach Lebertransplantation gesehen (Tab. 10.3). Im Gegensatz dazu konnten die intrahepatischen CD4<sup>hochpos</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten nur in der Frühphase nach Transplantation, also nach *in vivo* Aktivierung detektiert werden. Bei den CD4<sup>hochpos</sup>CD45RC<sup>hochpos</sup> scheint es sich um eine ausschließlich für die Leber charakteristische T-Zellpopulation zu handeln, da sie in der Milz nicht zu finden war.

Funktionelle Unterschiede zwischen aktivierten Gedächtniszellen (CD45RC<sup>neg</sup>) und ruhenden Gedächtniszellen (CD45RC<sup>pos</sup>) bestehen darin, dass die CD45RC<sup>neg</sup> schneller auf einen erneuten Antigenstimulus reagieren (Plebanski M, 1992; Young JL, 1997). CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten benötigen zwar nur einen geringeren Antigenstimulus als CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten um aktiviert zu werden (Leitnberg D, 1996), jedoch ist eine permanente Antigenpräsenz für ihre Existenz notwendig (Gray D, Skarvall H, 1988; Gray D, Matzinger P, 1991; Kündig TM, 1996). Dem gegenüber scheinen CD45RC<sup>pos</sup> Gedächtniszellen auch ohne persistierendes Antigen zu existieren (Bunce C, Bell EB, 1997).

### 6.3 Funktionelle Differenzierung intrahepatischer CD4<sup>+</sup> CD45RC T-Lymphozyten

T-Lymphozyten lassen sich nicht nur anhand ihrer Oberflächenmoleküle, sondern auch nach den von ihnen sezernierten Zytokinen differenzieren. Die wohl bekannteste Klassifizierung dieser Art ist die in Th1- und Th2-Zellen (Mosmann TR et al., 1986). Diesen Zellpopulationen wird dabei eine unterschiedliche Funktion im Laufe der Immunantwort zugesprochen. Anhand dieses Konzeptes lassen sich der Verlauf von Immunantworten unterschiedlicher Krankheiten verstehen (Lohoff M et al., 1998). Auch im Bereich der Organtransplantation scheint das Th1-Th2-Paradigma (Th1 = Abstoßung, Th2 = Toleranz) Gültigkeit zu haben, jedoch sind die immunologischen Vorgänge so komplex, dass die Datenlage hierzu nicht einheitlich ist (Farges O et al., 1994 und 1995; Conti F et al., 1998; Minguela A et al., 1999; Ganschow R et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde das Zytokinmuster der CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten näher analysiert. Im Mittelpunkt stand die Frage ob IL-13, das als Th2-Zytokin (Brown KD et al., 1989; McKenzie AN, 2000) in der Spätphase nach Transplantation nachgewiesen wurde (Otto C et al., 2002), von den CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> oder den CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten sezerniert wird. Zwar ist über die Funktion von IL-13 im Rahmen immunologischer Prozesse nach Lebertransplantation wenig bekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass IL-13 zusammen mit einem anti-IL-12 Antikörper und dendritischen Spenderzellen die Lebensdauer allogener Hauttransplantate signifikant verlängerte (Gorczynski RM et al., 1996). IL-13 ist in der Lage, die Produktion anderer Zytokine, wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , zu inhibieren (de Waal Malefyt R et al., 1993) und wirkt regulierend auf B-Lymphozyten, Monozyten sowie Granulozyten (McKenzie AN et al., 1993; Minty A et al., 1993; Punnonen J et al., 1993).

Wie in Tab. 4.2 dargestellt, wurden in intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten die beiden Th1-Zytokine INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  wesentlich häufiger nachgewiesen als

die beiden Th2-Zytokine IL-10 und IL-13. Auch die Expression dieser beiden Zytokine im semiquantitativen Nachweis war viel stärker als die von IL-10 und IL-13 (Abb. 4.3). In Bezug auf INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zeigte sich kein Unterschied zwischen den CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten. Dem gegenüber konnte jedoch gezeigt werden, dass die CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten stärker die Th2-Zytokine IL-10 und IL-13 exprimieren, während die CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten stärker die Th1-Zytokine INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  exprimieren. Auch war die Expression der Th2-Zytokine der CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten aus Lebertransplantaten gegenüber den Milzleukozyten deutlich gesteigert (Abb. 4.3).

Ein spezifisches Zytokinmuster entsprechend dem Th1-Th2 Paradigma konnte für die jeweilige Subpopulation der CD4<sup>+</sup>CD45RC T-Lymphozyten nach Lebertransplantation nicht nachgewiesen werden. Dies ist im Grund auch nicht zu erwarten, da nach Organtransplantation zwischen nicht identischen Individuen initial eine Immunaktivierung sowohl auf zellulärer als auch humoraler Ebene erfolgt. Dabei wird die zelluläre Immunität über die Th1-Zellen und die humorale Immunität über die Th2-Zellen vermittelt. Die Versuche bestätigen jedoch, dass aktive immunologische Prozesse nach Lebertransplantation im Transplantat selbst ablaufen. Die intrahepatischen CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten, welche sich durch ihre IL-10 und IL-13 Sekretion gegenüber den CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten und den CD4<sup>+</sup> Milzlymphozyten auszeichnen, könnten dabei die Wende zur immunologischen Toleranz einleiten.

## 7 Ausblick

Aktive immunologische Prozesse finden nach Lebertransplantation auch im Transplantat selbst statt. Maßgeblich daran beteiligt sind intrahepatische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Die CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten zeichnen sich dabei gegenüber den CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten und den CD4<sup>+</sup> Milzlymphozyten durch ihre IL-10 und IL-13 Sekretion aus. In wieweit die CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten und ihre sezernierten Zytokine einen immunsuppressiven Effekt ausüben, muss in weiteren *in vitro* Versuchen geklärt werden. In durchflusszytometrischen Analysen zeigte sich, dass die CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten zwei heterogene Zellpopulationen sind.

In Anlehnung an das von Bell EB 1998 beschriebene „Modell des immunologischen Gedächtnisses“ konnten in dieser Arbeit aktivierte Gedächtniszellen in der CD4<sup>pos</sup>CD45RC<sup>neg</sup> und ruhende Gedächtniszellen in der CD4<sup>pos</sup>CD45RC<sup>pos</sup> Lymphozytenpopulation beschrieben werden. Das verwendete Tiermodell (Abb. 1.2) könnte vor allem zur weiteren Erforschung der Rolle von persistierendem Antigen für das immunologische Gedächtnis genutzt werden.

Von besonderem Interesse wäre, durch Zell-Transferversuche den tolerogenen Effekt und damit die Funktion der CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten als Regulatorzellen nachzuweisen.

## 8 Zusammenfassung

Die Lebertransplantat-Spontantoleranz ist eines der immunologisch beeindruckendsten Phänomene. Die Fähigkeit, Toleranz für sich selbst und auch für mittransplantierte Organe über die MHC Barriere hinweg zu induzieren, ist einzigartig. Dies steht im Gegensatz zum zentralen Dogma der Transplantationsimmunologie, wonach MHC differente Organe nach Transplantation ohne Immunsuppression irreversibel zerstört werden.

Ziel der Arbeit war, die verschiedenen intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten durchflusszytometrisch zu charakterisieren und eine *in vitro* Aktivierung naiver Leukozyten mit der *in vivo* zu vergleichen. Dies wurde mit der Fragestellung verknüpft, ob es einen möglichen Phänotyp regulatorischer intrahepatischer T-Lymphozyten gibt, der für die Induktion von Spontantoleranz verantwortlich ist. Auch wurde das Zytokinmuster dieser intrahepatischen T-Lymphozyten bestimmt, um eine mögliche funktionelle Aussage treffen zu können.

Für die Versuche wurden Lebertransplantationen von Lewis-Spendertieren (LEW) auf Dark Agouti (DA) Empfänger durchgeführt. Die Transplantate wurden dauerhaft (> 300 Tage p.op.) spontan, d.h. ohne Immunsuppression toleriert. Andere vaskularisierte Organe, wie z.B. Herzen, wurden von DA-Empfängern abgestoßen. Die intrahepatischen und Milz T-Lymphozyten wurden an den Tagen 3, 30 und 100 nach Transplantation untersucht.

Unmittelbar nach Lebertransplantation kam es zu einem massiven Anstieg der intrahepatischen Leukozyten. Das Leberinfiltrat wurde dabei von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten dominiert (ca. 23 Prozent CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten), von denen ca. 50 Prozent den IL-2 Rezeptor exprimierten. Als Zeichen einer intrahepatischen Immunantwort wurde gewertet, dass das Verhältnis aktivierter CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> zu ruhenden CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten dynamisch war.

Zur funktionellen Charakterisierung der verschiedenen Populationen an CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden die Zytokinmuster dieser Zellen mit zwei verschiedenen Verfahren bestimmt. Zum einen wurden die sezernierten Zytokine INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-13, zum anderen deren spezifische mRNAs semiquantitativ nachgewiesen. Für die sezernierten Zytokine waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Subpopulationen nachzuweisen. Bei der Analyse der mRNA-Transkription zeigte sich jedoch, dass die CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten stärker die Th2-Zytokine IL-10 und IL-13 exprimierten, während die CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten stärker die Th1-Zytokine INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  exprimierten.

In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass die CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten jeweils heterogene Zellpopulationen sind, die noch in CD4<sup>pos</sup>CD45RC<sup>pos</sup>, CD4<sup>hochpos</sup>CD45RC<sup>hochpos</sup>, CD4<sup>pos</sup>CD45RC<sup>neg</sup> und CD4<sup>hochpos</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten differenziert werden können. Die CD4<sup>hochpos</sup>CD45RC<sup>hochpos</sup> repräsentieren dabei mit großer Wahrscheinlichkeit naive T-Lymphozyten, wohingegen die CD4<sup>hochpos</sup>CD45RC<sup>neg</sup> aktivierte T-Lymphozyten darstellen. Wir gehen davon aus, dass die CD4<sup>pos</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten auch ruhende Gedächtniszellen und die CD4<sup>pos</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten auch aktivierte Gedächtniszellen enthalten.

Der Nachweis intrahepatischer Gedächtnis T-Lymphozyten zeigt, dass die Leber immunologisch ein überaus interessantes Organ repräsentiert. Ihre Fähigkeit zur Induktion von Spontaneranz ist einzigartig, so dass von diesem Organ weitere grundlegende Erkenntnisse zum Phänomen der Toleranz erwartet werden.

## 9 Literatur

**Bell EB.** *Function of CD4 T cell subsets in vivo: expression of CD45R isoforms.* Semin Immunol. 1992 Feb; 4(1):43-50.

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

**Bickerstaff AA, VanBuskirk AM, Wakely E, Orosz CG.** *Transforming growth factor-beta and interleukin-10 subvert alloreactive delayed type hypersensitivity in cardiac allograft acceptor mice.* Transplantation. 2000 April 15;69(7):1517-20.

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

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

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

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

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

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

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

**Denton MD, Magee CC, Sayegh MH.** *Immunosuppressive strategies in transplantation.* Lancet 1999; 353: 1083-1091

**Farges O, Morris PJ, Dallman MJ.** *Spontaneous acceptance of liver allografts in the rat. Analysis of the immune response.* Transplantation 1994; 57: 171 - 177

**Farges O, Morris PJ, Dallman MJ.** *Spontaneous acceptance of rat liver allografts is associated with an early downregulation of intragraft interleukin-4 messenger RNA expression.* Hepatology 1995; 21: 767 - 775

**Fishman JA, Rubin RH.** *Infection in organ-transplant recipients.* N Engl J Med 1998; 338: 1741-1751

**Ganschow R, Nolkemper D, Hoffmann T, Giesecking J, Rogiers X, Broelsch CE, Burdelski M.** *Influence of Th1 and Th2 cytokine patterns on graft acceptance in pediatric liver transplantation.* Transplant Proc 1999; 31: 465 - 466

**Gassel HJ, Hutchinson IV, Engemann R, Morris PJ.** *The role of T suppressor cells in the maintenance of spontaneously accepted orthotopic rat liver allografts.* Transplantation 1992; 54: 1048-1053

**Gassel HJ und Steger U.** *Liver transplantation in the rat. aus Timmermann W, Gassel HJ, Ulrichs K, Zhong R, Thiede A. Organ transplantation in rats and mice.* Springer Verlag. Berlin. 1998; 123 - 131

**Gassel HJ, Otto C, Klein I, Steger U, Meyer D, Gassel AM, Ulrichs K, Thiede A.** *Persistence of stable intragraft cell chimerism in rat liver allografts after drug-induced tolerance.* Transplantation 2001; 71: 1848-1852

**Gassel HJ und Otto C.** *Mechanisms of Immune tolerance after orthotopic liver transplantation.* Transplant Linc 2002; 2: 49-58

- Geissler EK, Scherer MN, Graeb C.** Soluble donor MHC class I antigen inhibits immunologic priming in vitro and in vivo. *Transpl Int* 1998; 11 Suppl 1: 357 - 360
- Gillespie KM, Saoudi A, Kuhn J, Whittle CJ, Druet P, Bellon B, Mathieson PW.** Th1/Th2 cytokine gene expression after mercuric chloride in susceptible and resistant rat strains. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2388 - 2392
- Guillet M, Brouard K, Gagne K, Sebille F, Cuturi MC, Delsuc MA et al.** Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. *J Immunol* 2002; 168(10):5088-5095
- Gorczynski RM, Cohen Z, Fu XM, Hua Z, Sun Y, Chen Z.** Interleukin-13, in combination with anti-interleukin-12, increases graft prolongation after portal venous immunization with cultured allogeneic bone marrow-derived dendritic cells. *Transplantation* 1996; 62: 1592 - 1600
- Gray D, Skarvall H.** B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 1988; 336, 70-73
- Gray D, Matzinger P.** T cell memory is short-lived in the absence of antigen. *J. Exp. Med.* 1991; 174,0969-974
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG.** A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742
- Hara M, Kingsley C, Niimi M, Read S, Turvey S, Bushell A, Morris P, Powrie F, Wood K.** IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 2001; 166: 3789-3796
- Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S.** Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2002 Aug 5;196(3):389-99.
- Hutchinson IV.** Suppressor T cells in allogeneic models. *Transplantation.* 1986 May;41(5):547-55.
- Josien R, Douillard P, Guillot C, Muschen M, Anegon I, Chetritt J, Menoret S, Vignes C, Souillou JP, Cuturi MC.** A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J Clin Invest.* 1998 Dec 1;102(11):1920-6.
- Kamada N, Brons G, Davies HS.** Fully allogeneic liver grafting in rats induces a state of systemic nonreactivity to donor transplantation antigens. *Transplantation* 1980; 29: 429 - 431
- Kamada N und Wight DGD.** Antigen-specific immunosuppression induced by liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1984; 38: 217 - 221
- Kamada N, Shinomiya T.** Clonal deletion as the mechanism of abrogation of immunological memory following liver grafting in rats. *Immunology* 1985; 55: 85-90
- Kauczok J.** Toleranz und Abstoßung nach experimenteller Lebertransplantation: Charakterisierung intrahepatischer CD4+ T-Lymphozyten. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2005
- Kerteß T.** Biologie der Transplantatabstoßung: Nachweis antigenspezifischer T-Lymphozyten und Charakterisierung ihres T-Zellrezeptor-Repertoires. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2007
- Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ.** CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1080-6.
- Kruse JJ, Bart CI, Leer JW, Wondergem J.** Detection and quantitative measurement of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) gene expression using a semi-nested competitive PCR assay. *Cytokine* 1999; 11: 179 - 185
- Kundig TM, Bachmann MF, Ohashi PS, Pircher H, Hengartner H, Zinkernagel RM.** On T cell memory: arguments for antigen dependence. *Immunol Rev.* 1996 Apr;150:63-90. Review.
- Lechler RI, Batchelor JR.** Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts: effect of including chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of second recipient. *J Exp Med* 1982; 156: 1835-1841

- Leitenberg D, Novak TJ, Farber D, Smith BR, Bottomly K.** *The extracellular domain of CD45 controls association with the CD4-T cell receptor complex and the response to antigen-specific stimulation.* J Exp Med. 1996 Jan 1;183(1):249-59.
- Lohoff M, Gessner A, Bogdan C, Rollinghoff M.** *The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis.* Int Arch Allergy Immunol; 1998; 115(3):191-202
- McKenzie AN, Culpepper J, de Waal Malefyt R, Briere F.** *Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function.* Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 3735 - 3739
- McKenzie AN.** *Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13.* Pharmacol Ther 2000; 88: 143 – 151
- Medawar PB.** *The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits.* J Anat 1944; 78: 176-199
- Merrill JP, Murray JE, Harrison H et al.** *Successful homotransplantation of the kidney between nonidentical twins.* N Engl J Med 1960; 262: 1251
- Meyer D, Otto C, Gasser M, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A.** *Concomitant liver transplantation reduces the rate of chronic small bowel allograft rejection.* Transplant Proc 2002; 34: 1040 - 1041
- Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC.** *Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms.* Nature 1992; Nov 19;360(6401):264-5.
- Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liautun P, Miloux B.** *Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune response.* Nature 1993; 362: 248 - 250
- Minguela A, Torio A, Marin L, Sanchez-Bueno F, Garcia-Alonso AM, Ontanon J, Parrilla P, Alvarez-Lopez MR.** *Implication of Th1, Th2, and Th3 cytokines in liver graft acceptance.* Transplant Proc 1999; 31: 519 - 520
- Miyanari N, Yamaguchi Y, Matsuno K, Tominaga A, Goto M, Ichiguchi O, Mori K, Ogawa M.** *Persistent infiltration of CD45RC- CD4+ T cells, Th2-like effector cells, in prolonging hepatic allografts in rats pretreated with a donor-specific blood transfusion.* Hepatology 1997; 25: 1008 - 1013
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J Immunol 1986; 136: 2348 - 2357
- Murray JE, Merrill JP, Harrison JH.** *Renal Homotransplantation in identical twins.* Surg Forum 1955; 6: 432-436
- Murray JE, Merrill JP, Harrison JH.** *Prolonged survival of human kidney homografts by immunosuppressive drug therapy.* N Engl J Med 1963; 268: 1315
- Opelz G, Henderson R.** *Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients.* Lancet 1993; 342: 1514-1516
- Otto C, Kauczok J, Martens N, Steger U, Möller I, Meyer D, Timmermann W, Ulrichs K, Gassel HJ.** *Mechanisms of tolerance induction after rat liver transplantation: Intrahepatic CD4+ T cells produce different cytokines during rejection and tolerance in response to stimulation.* J Gastrointest Surg 2002; 6: 455 – 463
- Plebanski M, Saunders M, Burtles SS, Crowe S, Hooper DC.** *Primary and secondary human in vitro T-cell responses to soluble antigens are mediated by subsets bearing different CD45 isoforms.* Immunology. 1992 Jan;75(1):86-91.
- Powrie F und Mason D.** *The MRC OX-22- CD4+ T cells that help B cells in secondary immune responses derive from naive precursors with the MRC OX-22+ CD4+ phenotype.* J Exp Med 1989; 169: 653 - 662
- Powrie F und Mason D.** *OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset.* J Exp Med 1990a; 172: 1701 – 1708

- Powrie F und Mason D.** *Subsets of rat CD4+ T cells defined by their differential expression of variants of the CD45 antigen: developmental relationships and in vitro and in vivo functions.* Curr Top Microbiol Immunol 1990b; 159: 79 - 96
- Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE.** *Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 3730 - 3734
- Puppo F, Scudeletti M, Indiveri F, Ferrone S.** *Serum HLA class I antigens: markers and modulators of an immune response?* Immunol Today 1995; 16: 124 - 127
- Rasmussen A, Davies H, Jamieson N, Evans D, Calne R.** *Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival.* Transplantation 1995; 59: 919 - 921
- Read S, Malmstrom V, Powrie F.** *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+ CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation.* J Exp Med 2000; 192: 295-302
- Sarawar SR, Sparshott SM, Sutton P, Yang CP, Hutchinson IV, Bell EB.** *Rapid re-expression of CD45RC on rat CD4 T cells in vitro correlates with a change in function.* Eur J Immunol 1993; 23: 103 - 109
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M.** *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.* J Immunol 1995; 155: 1151-1164
- Salomon B, Bluestone J.** *Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation.* Annu Rev Immunol 2001; 19: 225-252
- Schwartz RS, Dameshek W.** *Drug-induced immunological tolerance.* Nature 1959; 183: 1682
- Seino KI et al.** *Requirement for natural killer T (NKT) cells reciprocally regulate acute graft-versus-host disease.* Blood 1999; 99: 1449-1457
- Siegling A, Lehmann M, Platzer C, Emmrich F, Volk HD.** *A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats.* J Immunol Methods 1994; 177: 23 - 28
- Sparshott SM und Bell EB.** *Membrane CD45R isoform exchange on CD4 T cells is rapid, frequent and dynamic in vivo.* Eur J Immunol 1994; 24: 2573 - 2578
- Spickett GP, Brandon MR, Mason D, Williams AF, Woollett GR.** *MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen.* J Exp Med 1983; 158: 795 - 810
- Starzl TE, Demetris A, Murase N, Thomson AW, Trucco M, Ricordi C.** *Donor cell chimerism permitted by immunosuppressive drugs: a new view of organ transplantation.* Immunol Today 1993; 14: 326 - 332
- Swain SL, Croft M, Dubey C, Haynes L, Rogers P, Zhang X, Bradley LM.** *From naive to memory T cells.* Immunol Rev 1996; 150: 143 - 167
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak T, Sakaguchi S.** *Immunologic self-tolerance maintained by CD4+CD25+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.* J Exp Med 2000; 192: 303-309
- Tough DF, Sprent J.** *Turnover of naive- and memory-phenotype T cells.* J Exp Med. 1994 Apr 1; 179(4): 1127-35.
- Trowbridge IS, Thomas ML.** *CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development.* Annu Rev Immunol. 1994;12:85-116
- Van der Borgh A, van der Aa A, Geusens P, Vandevyver C, Raus J, Stinissen P.** *Identification of overrepresented T cell receptor genes in blood and tissue biopsies by PCR-ELISA.* J Immunol Methods 1999; 223(1): 47-61
- Walsh PT, Strom TB, Turka LA.** *Routes to Transplant Tolerance versus Rejection: The Role of Cytokines.* Immunity 2004; 20: 121 - 131

- Wang C, Sun J, Li L, Wang L, Dolan P, Sheil AG.** *Conversion of pancreas allograft rejection to acceptance by liver transplantation.* Transplantation 1998; 65: 188 - 192
- Wells AD, Walsh MC, Bluestone JA, Turka LA.** *Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy.* J Clin Invest. 2001 Sep;108(6):895-903.
- Wood KJ, Hara M, Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Morris PJ.** *Immunoregulatory T-cells can mediate specific unresponsiveness to alloantigens in vivo.* Transplant Proc. 2001 Nov-Dec;33(7-8):3829-30
- Wood KJ und Sakaguchi S.** *Regulatory T cells in transplantation tolerance.* Nat Rev Immunol 2003; 3: 199 - 210
- Zhou K, Carr RI, Liwski RS, Stadnyk AW, Lee GTD.** *Oral exposure to alloantigen generates intragraft CD8+ regulatory cells.* J Immunoll. 2001; 167: 107-113
- Young JL, Ramage JM, Gaston JS, Beverley PC.** *In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells.* Eur J Immunol. 1997 Sep;27(9):2383-90.
- Zavazava N und Krönke M.** *Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in allogeneic cytotoxic T Lymphocytes.* Nature Medicine 1996; 2: 1005 - 1010
- Zhang Z, Yang L, Young K, Du Temple B, Zhang B.** *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and ist mechanisam of suppression.* Nature 2000 Med.6 782-789
- Zimmermann FA, Davies HS, Knoll PP, Gokel JM, Schmidt T.** *Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the fate of the graft.* Transplantation 1984; 37: 406 - 410

## 10 Anhang

### A.1 Durchflusszytometrische Analysen

Tab. 10.1: Färbeprotokoll der standardisierten durchflusszytometrischen Analyse intrahepatischer Leukozyten. Die mit grau unterlegten Kombinationen wurden für die Auswertungen im Ergebnisteil genutzt (Abb. 10.6). \*1: unkonjugiert; Färbung über Sekundärantikörper IgG „Esel-anti-Maus“, PE-konjugiert.

Proben Nummer	FITC konjugierter AK	PE konjugierter AK	
1	Solo		
2			7 AAD
3	Isotypenkontrolle		7 AAD
4		Isotypenkontrolle	7 AAD
5		Ox-1	7 AAD
6		Ox-18	7 AAD
7		MN-4-91-6* <sup>1</sup>	7 AAD
8		NDS-60* <sup>1</sup>	7 AAD
9	W3/25		7 AAD
10		W3/25	7 AAD
11	W3/25	R-73	7 AAD
12	Ox-8	R-73	7 AAD
13	Ox-42	R-73	7 AAD
14	10/78	R-73	7 AAD
15	ED-2	R-73	7 AAD
16	Ox-42	Ox-6	7 AAD
17	Ox-33	Ox-6	7 AAD
18	R-73	Ox-6	7 AAD
19	Ox-42	W3/25	7 AAD
20	Ox-7	W3/25	7 AAD
21	Ox-22	W3/25	7 AAD
22	10/78	W3/25	7 AAD
23	10/78	Ox-8	7 AAD
24	Ox-22	Ox-8	7 AAD
25	W3/25	Ox-22	7 AAD
26	Ox-39	Ox-22	7 AAD
27	Ox-39	W3/25	7 AAD

Tab. 10.2: Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer Leukozyten und Milzleukozyten aus DA- und LEW-Ratten unmittelbar nach Isolierung der Zellen. Bei den Analysen wurden entsprechend der Größe und Granularität (FSC/SSC) der Zellen verschiedene Regionen (= Zellpopulationen) definiert. Region 1 (R1) entsprach dabei der Region, in der mehr als 95 Prozent der Leukozyten konzentriert waren (Abb. 10.4). Alle Angaben sind prozentuale Anteile an R1. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei Analysen.

		Lewis Leber		DA Leber		DA Milz	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Region 1	[% aller Zählereignisse]	62,4	6,9	48,8	6,3	58,5	4,6
Leukozyten Gesamt	Ox-1 <sup>pos</sup>	92,5	6,3	94,7	1,6	98,4	0,5
Vitale Leukozyten	7-AAD <sup>neg</sup>	98,2	0,6	97,4	1,4	96,1	1,7
MHC Klasse I-positive Zellen	Ox-18 <sup>pos</sup>	86,6	0,8	82,4	0,8	78,6	0,9
MHC Klasse II-positive Zellen	Ox-6 <sup>pos</sup>	21,8	6,5	21,5	7,1	46,2	0,8
RT1 <sup>avi</sup> ("DA-spezifische" Zellen)	MN-4 <sup>pos</sup>	n.d.	n.d.	98,4	0,6	99,3	0,3
RT1 <sup>l</sup> ("LEW-spezifische" Zellen)	NDS-60 <sup>pos</sup>	99,1	0,2	n.d.	n.d.	0,8	0,2
<hr/>							
T-Lymphozyten Gesamt	R73 <sup>pos</sup>	25,3	1,2	23,4	5,6	43,6	2,8
MHC-Klasse II-positive T-Lymphozyten	R73 <sup>pos</sup> Ox-6 <sup>pos</sup>	3,3	0,1	6,9	0,8	4,8	1,7
W3/25-positive Zellen Gesamt	W3/25 <sup>pos</sup>	n.d.	n.d.	14,2	2,2	33,1	2,5
CD45RC Zellen Gesamt	Ox-22 <sup>pos</sup>	50,7	6,9	62,5	5,0	80,0	0,9
<hr/>							
CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	R73 <sup>pos</sup> W325 <sup>pos</sup>	16,6	1,1	15,1	4,0	35,1	1,9
CD4 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>neg</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>pos</sup> Ox22 <sup>neg</sup>	10,3	0,4	6,9	1,4	13,0	0,6
CD4 <sup>hochpos</sup> CD45RC <sup>neg</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>hochpos</sup> Ox-22 <sup>neg</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CD4 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>pos</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>pos</sup>	10,9	3,0	8,6	2,3	20,5	1,0
CD4 <sup>hochpos</sup> CD45RC <sup>hochpos</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>hochpos</sup> Ox22 <sup>hochpos</sup>	n.d.	n.d.	4,1	0,7	n.d.	n.d.
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>pos</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>pos</sup> Ox-39 <sup>pos</sup>	n.d.	n.d.	2,3	0,2	3,2	0,3
	W325 <sup>pos</sup> Ox-39 <sup>neg</sup>	n.d.	n.d.	11,9	2,3	29,9	2,2
<hr/>							
CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	R73 <sup>pos</sup> Ox-8 <sup>pos</sup>	9,9	1,5	8,0	0,9	9,2	1,2
CD8 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>pos</sup>	Ox-8 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>pos</sup>	n.d.	n.d.	26,8	6,4	12,4	0,3
CD8 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>neg</sup>	Ox-8 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>neg</sup>	n.d.	n.d.	28,3	7,5	4,4	0,8
<hr/>							
Naive T-Lymphozyten: CD90 <sup>pos</sup>	Ox-7 <sup>pos</sup>	22,9	3,3	21,7	2,2	17,6	2,8
	W325 <sup>pos</sup> Ox-7 <sup>pos</sup>	6,5	2,3	8,9	1,9	4,5	0,3
	W325 <sup>hochpos</sup> Ox-7 <sup>pos</sup>	0,0	0,0	4,1	0,9	n.d.	n.d.
<hr/>							
NK-Zellen: CD161 <sup>pos</sup>	10/78 <sup>pos</sup>	27,5	5,0	41,2	2,6	3,6	0,8
CD161 <sup>pos</sup> CD8 <sup>pos</sup>	10/78 <sup>pos</sup> Ox-8 <sup>pos</sup>	25,1	3,4	38,9	0,8	3,2	0,5
CD161 <sup>pos</sup> CD3 <sup>pos</sup>	10/78 <sup>pos</sup> R73 <sup>pos</sup>	3,0	1,2	1,9	0,3	0,3	0,2
<hr/>							
Monozyten / Makrophagen: CD11 b/c <sup>pos</sup>	Ox-42 <sup>pos</sup>	49,4	5,2	46,6	6,8	28,6	8,4
	Ox-42 <sup>pos</sup> Ox6 <sup>pos</sup>	7,7	0,9	11,2	1,7	17,3	1,2
	Ox-42 <sup>pos</sup> R73 <sup>pos</sup>	5,9	1,6	4,3	0,5	2,6	1,4
	Ox-42 <sup>pos</sup> R73 <sup>neg</sup>	45,5	1,7	42,3	6,3	26,0	7,1
	Ox-8 <sup>pos</sup> R73 <sup>neg</sup>	49,6	4,6	58,8	4,6	20,4	1,4
	W325 <sup>intermediat</sup>	21,4	1,4	15,2	2,9	6,9	0,8
	ED2 <sup>pos</sup>	11,6	3,1	14,4	2,4	27,3	0,4
	ED2 <sup>pos</sup> R73 <sup>pos</sup>	4,0	0,8	2,4	0,5	5,5	0,5
	ED2 <sup>pos</sup> R73 <sup>neg</sup>	9,0	0,8	12,0	2,3	21,8	0,2
<hr/>							
B-Lymphozyten: CD45RA <sup>pos</sup>	Ox-33 <sup>pos</sup>	15,1	2,4	14,1	3,1	30,9	1,7
	Ox-33 <sup>pos</sup> Ox-6 <sup>pos</sup>	15,4	3,6	9,2	0,7	29,9	1,0
Anzahl der Zell-Isolierungen		n=3		n=3		n=3	

Tab. 10.3: Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer Leukozyten aus spontantoleranten Lebertransplantaten (LEW-nach-DA) unmittelbar nach Isolierung. Alle Angaben sind prozentuale Anteile an R1. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei Analysen.

		Tag 3		Tag 30		Tag 100	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Region 1	[% aller Zählereignisse]	55,1	1,4	68,4	9,2	70,2	7,5
Leukozyten Gesamt	Ox-1 <sup>pos</sup>	92,8	1,9	98,2	0,7	80,4	9,6
Vitale Leukozyten	7-AAD <sup>neg</sup>	96,6	0,2	97,1	1,5	95,0	3,4
MHC Klasse I-positive Zellen	Ox-18 <sup>pos</sup>	82,0	1,9	78,9	3,8	84,3	2,7
MHC Klasse II-positive Zellen	Ox-6 <sup>pos</sup>	20,3	1,4	16,5	4,2	11,5	3,3
RT1 <sup>avi</sup> ("DA-spezifische" Zellen)	MN-4 <sup>pos</sup>	68,2	39,6	97,1	1,7	97,6	0,9
RT1 <sup>l</sup> ("LEW-spezifische" Zellen)	NDS-60 <sup>pos</sup>	5,5	0,9	2,7	1,7	2,2	0,4
<hr/>							
T-Lymphozyten Gesamt	R73 <sup>pos</sup>	46,1	4,8	37,9	5,2	24,1	7,0
MHC-Klasse II-positive T-Lymphozyten	R73 <sup>pos</sup> Ox-6 <sup>pos</sup>	8,7	5,5	5,6	2,9	5,1	2,9
W3/25-positive Zellen Gesamt	W3/25 <sup>pos</sup>	27,2	2,0	15,9	1,1	16,9	5,3
CD45RC Zellen Gesamt	Ox-22 <sup>pos</sup>	46,6	14,0	44,6	7,0	54,5	12,3
<hr/>							
CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	R73 <sup>pos</sup> W325 <sup>pos</sup>	29,6	3,9	17,5	1,8	12,2	3,5
CD4 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>neg</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>pos</sup> Ox22 <sup>neg</sup>	8,0	1,0	11,1	0,9	7,9	2,5
CD4 <sup>hochpos</sup> CD45RC <sup>neg</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>hochpos</sup> Ox-22 <sup>neg</sup>	13,6	0,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CD4 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>pos</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>pos</sup>	4,6	0,5	6,6	1,3	5,6	2,9
CD4 <sup>hochpos</sup> CD45RC <sup>hochpos</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>hochpos</sup> Ox22 <sup>hochpos</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,9	0,3
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>pos</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>pos</sup> Ox-39 <sup>pos</sup>	13,7	1,6	2,6	0,7	3,2	0,6
	W325 <sup>pos</sup> Ox-39 <sup>neg</sup>	13,6	0,9	13,3	0,8	13,7	5,4
<hr/>							
CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	R73 <sup>pos</sup> Ox-8 <sup>pos</sup>	18,6	7,4	19,2	6,9	13,5	6,4
CD8 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>pos</sup>	Ox-8 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>pos</sup>	15,2	1,4	21,7	3,4	21,8	2,0
CD8 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>neg</sup>	Ox-8 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>neg</sup>	22,5	2,4	41,7	8,0	31,0	11,3
<hr/>							
Naive T-Lymphozyten: CD90 <sup>pos</sup>	Ox-7 <sup>pos</sup>	28,9	8,4	10,5	0,7	30,9	13,1
	W325 <sup>pos</sup> Ox-7 <sup>pos</sup>	2,9	0,8	2,2	0,4	5,6	1,4
	W325 <sup>hochpos</sup> Ox-7 <sup>pos</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,6	0,5
<hr/>							
NK-Zellen: CD161 <sup>pos</sup>	10/78 <sup>pos</sup>	8,1	0,6	19,6	4,1	26,4	9,4
CD161 <sup>pos</sup> CD8 <sup>pos</sup>	10/78 <sup>pos</sup> Ox-8 <sup>pos</sup>	5,9	0,2	13,3	1,2	28,6	9,1
CD161 <sup>pos</sup> CD3 <sup>pos</sup>	10/78 <sup>pos</sup> R73 <sup>pos</sup>	1,2	0,5	1,0	0,4	2,2	1,3
<hr/>							
Monozyten / Makrophagen: CD11 b/c <sup>pos</sup>	Ox-42 <sup>pos</sup>	34,2	6,3	20,6	7,4	42,7	14,8
	Ox-42 <sup>pos</sup> Ox6 <sup>pos</sup>	7,3	0,7	3,8	1,8	5,8	2,1
	Ox-42 <sup>pos</sup> R73 <sup>pos</sup>	2,7	0,7	1,9	0,9	3,4	2,3
	Ox-42 <sup>pos</sup> R73 <sup>neg</sup>	31,6	5,8	18,8	7,1	39,4	17,0
	Ox-8 <sup>pos</sup> R73 <sup>neg</sup>	34,7	3,8	51,9	5,4	65,0	11,2
	W325 <sup>intermediat</sup>	6,2	1,0	10,1	3,7	15,2	2,9
	ED2 <sup>pos</sup>	30,2	3,3	9,4	3,0	28,0	10,4
	ED2 <sup>pos</sup> R73 <sup>pos</sup>	4,6	0,6	1,5	0,4	2,7	1,3
	ED2 <sup>pos</sup> R73 <sup>neg</sup>	25,6	3,6	7,8	2,8	25,3	11,6
<hr/>							
B-Lymphozyten: CD45RA <sup>pos</sup>	Ox-33 <sup>pos</sup>	23,0	4,4	12,6	1,3	21,6	16,2
	Ox-33 <sup>pos</sup> Ox-6 <sup>pos</sup>	12,4	0,9	9,2	0,7	5,7	2,0
Anzahl der Zell-Isolierungen		n=3		n=4		n=4	

Tab. 10.4: Durchflusszytometrische Analyse von Milzleukozyten nach Lebertransplantation im spontantoleranten Tiermodell (LEW-nach-DA) unmittelbar nach Isolierung. Alle Angaben sind prozentuale Anteile an R1. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei Analysen.

		Tag 3		Tag 30		Tag 100	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Region 1	[% aller Zählereignisse]	61,1	7,8	58,6	2,9	56,5	1,1
Leukozyten Gesamt	Ox-1 <sup>pos</sup>	95,7	0,8	98,7	0,3	90,2	7,6
Vitale Leukozyten	7-AAD <sup>neg</sup>	97,9	0,6	97,7	0,5	96,7	0,6
MHC Klasse I-positive Zellen	Ox-18 <sup>pos</sup>	79,7	0,2	77,1	2,5	76,5	0,5
MHC Klasse II-positive Zellen	Ox-6 <sup>pos</sup>	46,8	6,4	54,0	4,1	44,8	5,5
RT1 <sup>avi</sup> ("DA-spezifische" Zellen)	MN-4 <sup>pos</sup>	99,6	0,2	99,5	0,2	99,4	0,3
RT1 <sup>i</sup> ("LEW-spezifische" Zellen)	NDS-60 <sup>pos</sup>	0,4	0,1	0,6	0,2	0,4	0,2
<hr/>							
T-Lymphozyten Gesamt	R73 <sup>pos</sup>	35,8	2,2	38,9	4,0	50,6	5,0
MHC-Klasse II-positive T-Lymphozyten	R73 <sup>pos</sup> Ox-6 <sup>pos</sup>	6,1	1,7	4,8	1,5	6,1	0,9
W3/25-positive Zellen Gesamt	W3/25 <sup>pos</sup>	27,5	2,2	27,2	1,8	36,2	1,0
CD45RC Zellen Gesamt	Ox-22 <sup>pos</sup>	77,0	1,4	80,7	1,1	76,9	1,9
<hr/>							
CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	R73 <sup>pos</sup> W325 <sup>pos</sup>	28,2	1,1	29,5	2,9	34,6	2,0
CD4 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>neg</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>pos</sup> Ox22 <sup>neg</sup>	13,8	0,9	13,0	0,6	12,4	0,5
CD4 <sup>hochpos</sup> CD45RC <sup>neg</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>hochpos</sup> Ox-22 <sup>neg</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CD4 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>pos</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>pos</sup>	14,0	1,7	15,5	1,7	21,6	1,5
CD4 <sup>hochpos</sup> CD45RC <sup>hochpos</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>hochpos</sup> Ox22 <sup>hochpos</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>pos</sup> T-Lymphozyten	W325 <sup>pos</sup> Ox-39 <sup>pos</sup>	3,8	0,3	2,4	0,2	3,4	1,2
	W325 <sup>pos</sup> Ox-39 <sup>neg</sup>	23,7	2,4	24,8	1,7	32,8	0,5
<hr/>							
CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	R73 <sup>pos</sup> Ox-8 <sup>pos</sup>	7,9	1,4	6,9	1,4	10,5	2,5
CD8 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>pos</sup>	Ox-8 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>pos</sup>	8,2	0,8	9,9	0,8	18,3	5,9
CD8 <sup>pos</sup> CD45RC <sup>neg</sup>	Ox-8 <sup>pos</sup> Ox-22 <sup>neg</sup>	3,8	0,6	4,2	0,2	22,1	19,3
<hr/>							
Naive T-Lymphozyten: CD90 <sup>pos</sup>	Ox-7 <sup>pos</sup>	23,6	4,4	18,9	3,0	20,3	2,5
	W325 <sup>pos</sup> Ox-7 <sup>pos</sup>	3,5	0,3	4,0	0,8	5,2	1,6
	W325 <sup>hochpos</sup> Ox-7 <sup>pos</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<hr/>							
NK-Zellen: CD161 <sup>pos</sup>	10/78 <sup>pos</sup>	1,6	0,2	2,1	0,5	3,3	1,4
CD161 <sup>pos</sup> CD8 <sup>pos</sup>	10/78 <sup>pos</sup> Ox-8 <sup>pos</sup>	1,1	0,1	1,1	0,2	2,7	1,1
CD161 <sup>pos</sup> CD3 <sup>pos</sup>	10/78 <sup>pos</sup> R73 <sup>pos</sup>	0,3	0,1	0,4	0,1	0,5	0,2
<hr/>							
Monozyten / Makrophagen: CD11 b/c <sup>pos</sup>	Ox-42 <sup>pos</sup>	23,8	2,4	18,8	0,5	26,5	12,9
	Ox-42 <sup>pos</sup> Ox6 <sup>pos</sup>	16,9	4,6	12,8	1,1	15,1	0,6
	Ox-42 <sup>pos</sup> R73 <sup>pos</sup>	1,1	0,2	1,0	0,3	2,8	1,3
	Ox-42 <sup>pos</sup> R73 <sup>neg</sup>	22,7	2,3	17,8	0,5	23,7	11,6
	Ox-8 <sup>pos</sup> R73 <sup>neg</sup>	13,9	1,0	15,2	2,0	20,7	2,0
	W325 <sup>intermediat</sup>	7,6	0,3	8,4	0,3	15,1	3,0
	ED2 <sup>pos</sup>	28,0	2,0	23,2	2,3	22,0	1,0
	ED2 <sup>pos</sup> R73 <sup>pos</sup>	3,9	0,5	4,2	0,3	3,5	1,2
	ED2 <sup>pos</sup> R73 <sup>neg</sup>	24,1	2,4	19,0	2,0	18,6	2,2
<hr/>							
B-Lymphozyten: CD45RA <sup>pos</sup>	Ox-33 <sup>pos</sup>	32,5	1,3	39,5	4,0	25,1	0,8
	Ox-33 <sup>pos</sup> Ox-6 <sup>pos</sup>	30,2	1,3	38,5	3,7	24,2	0,5
Anzahl der Zell-Isolierungen		n=3		n=3		n=4	

## **A.2 Die Immunantwort nach Lebertransplantation**

### *Klinischer Verlauf lebertransplanteder Tiere*

Das klinische Bild der lebertransplantierten Ratten wurde täglich beobachtet. Dabei wurden die Tiere gewogen und die Vigilanz, die Körperhaltung sowie die Fellbeschaffenheit beurteilt. Darüber hinaus wurde zur Objektivierung der Transplantatfunktion die Leber perkutan palpiert.

In der Abstoßungsgruppe (REJ) fanden sich postoperativ die stärksten klinischen Veränderungen. Die Tiere litten unter großem Gewichtsverlust, Vigilanzeinschränkung sowie einem zunehmenden Ikterus als Zeichen der Organdysfunktion. Sie verstarben an Tag 12 p.op. aufgrund einer akuten und fulminanten Abstoßung des Transplantates. Die Tiere der Spontantoleranzgruppe (TOL) zeigten ähnliche, jedoch schwächer ausgeprägte Symptome. Nach dem Tiefpunkt einer Krise an Tag 7 p.op. erreichten sie an Tag 17 p.op. wieder ihr Ausgangsgewicht. Erwartungsgemäß erholten sich die Tiere der syngenen Kontrollgruppe (SYN) postoperativ am schnellsten. Sie erreichten ihr Ausgangsgewicht bereits am Tag 12 p.op.

### *Quantifizierung der Immunreaktion*

Um die Immunreaktion nach Lebertransplantation nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ bestimmen zu können, wurden die Leukozyten aus dem Organ isoliert und die Infiltrationsstärke als Leukozytenanzahl pro Gramm Leber bestimmt (Abb. 10.1). Dazu wurden die isolierten Zellen mit einer Trypan-Blau Lösung gefärbt und die Zellzahl in einer Zählkammer ausgezählt. Nur ungefärbte Zellen wurden als vitale Zellen betrachtet. Die gewonnene Anzahl von Leberleukozyten und Milzleukozyten transplanteder und nicht-transplanteder LEW- und DA-Ratten ist in Tab. 10.5 aufgeführt.

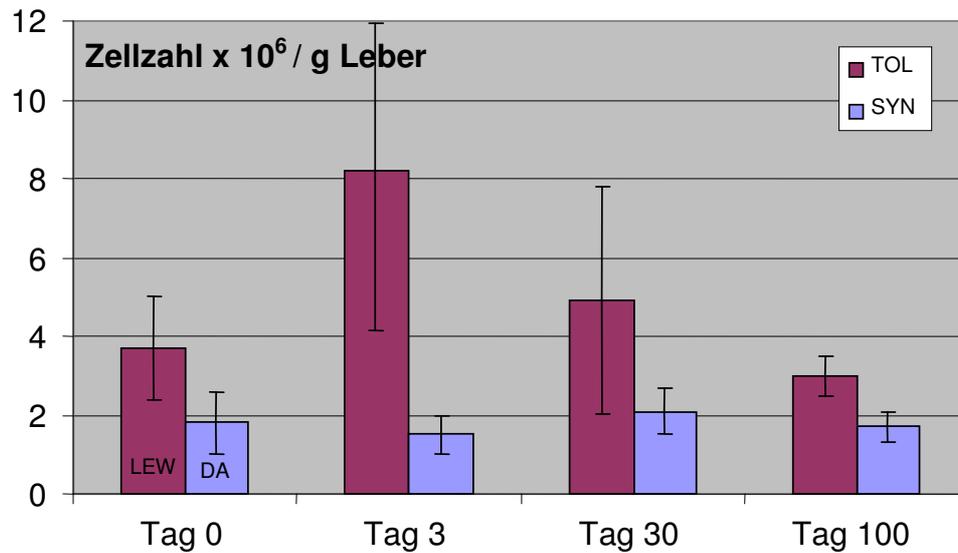


Abb. 10.1: Infiltration des Lebertransplantates durch Empfänger-Leukozyten nach Lebertransplantation in der spontantoleranten Rattenstammkombination LEW-nach-DA (TOL-Gruppe). In der Kontrollgruppe wurden Lebern DA-nach-DA transplantiert (SYN-Gruppe). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils drei Versuchen.

Tab. 10.5: Absolute Zellzahlen isolierter intrahepatischer Leukozyten (A) und von Milzleukozyten (B) unmittelbar nach Isolierung. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei Isolierungen pro Gruppe.

A)	Isolierte intrahepatische Leukozyten [x 10 <sup>6</sup> ]					
	LEW n = 8	DA n = 28	DA-SYN n = 3	Tag 3 n = 20	Tag 30 n = 16	Tag 100 n = 3
Zellzahl absolut	34,5 ± 1,7	16,0 ± 7,3	8,3 ± 1,5	73,1 ± 38,2	44,8 ± 21,7	28,5 ± 3,5
Lebergewicht [g]	9,5 ± 1,3	9,1 ± 1,1	5,9 ± 1,7	8,6 ± 0,9	9,5 ± 1,3	9,5 ± 0,4
Zellzahl / g Leber	3,7 ± 1,3	1,8 ± 0,8	1,5 ± 0,5	8,2 ± 0,39	4,9 ± 2,9	3,0 ± 0,5

B)	Isolierte Milzleukozyten [ $\times 10^8$ ]				
	LEW n = 3	DA n = 7	Tag 3 n = 5	Tag 30 n = 3	Tag 100 n = 3
Zellzahl absolut	$2,4 \pm 0,4$	$1,7 \pm 1,4$	$1,8 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,5$
Leber- gewicht [g]	$1,0 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,4$	$0,5 \pm 1,5$	$0,7 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,5$
Zellzahl / g Leber	$2,7 \pm 0,9$	$3,5 \pm 1,9$	$3,5 \pm 1,2$	$3,6 \pm 1,9$	$2,9 \pm 1,7$

### Austausch intrahepatischer LEW-Leukozyten gegen DA-Leukozyten

Unmittelbar nach allogener Transplantation „emigrierten“ die „Transplantat-eigenen“, LEW-spezifischen Leukozyten aus der Leber und wurden durch Leukozyten des DA-Empfängers ersetzt. Bereits in der Frühphase an Tag 3 waren in der Leber nur noch 5 Prozent LEW-spezifische Leukozyten mit dem Antikörper NDS-60 (anti-RT1<sup>l</sup>) nachzuweisen. Der Hauptanteil mit über 70 Prozent wurde durch DA-spezifische Leukozyten gestellt (MN-4 = anti-RT1<sup>avl</sup>). Ab Tag 30 waren die transplantierten Lebern dann vollständig mit MN-4<sup>pos</sup> Leukozyten besiedelt (Abb. 10.2, Tab. 10.6).

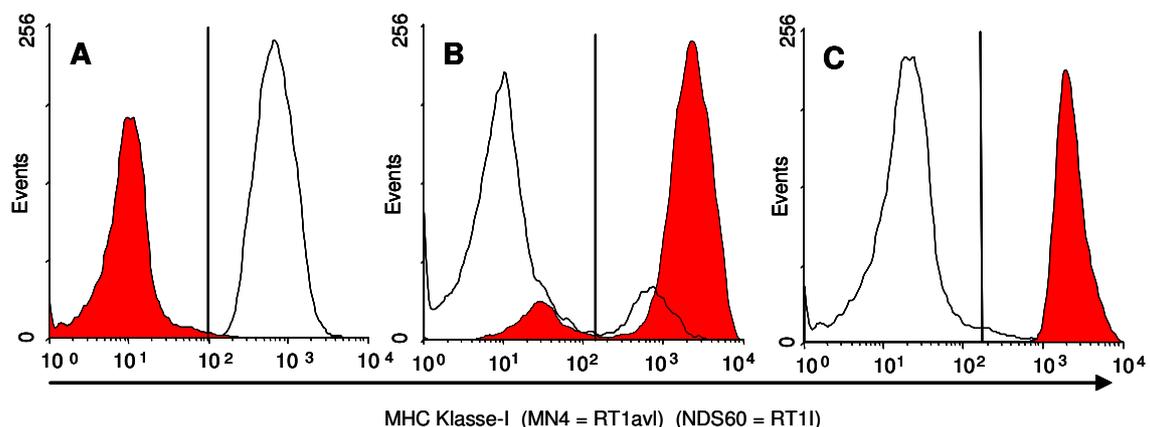


Abb. 10.2: Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer Leukozyten nicht-transplantiert (A) und spontantoleranter LEW-Lebern 3 Tage (B) und 100 Tage (C) p.op. Nach Transplantation verringerte sich der Anteil spenderspezifischer Leukozyten (LEW = MHC-Haplotyp RT1<sup>l</sup>) kontinuierlich und wurde durch empfangerspezifische Leukozyten (DA = MHC-Haplotyp RT1<sup>avl</sup>) ersetzt. Ausgefülltes Histogramm = DA spezifische MN-4<sup>pos</sup> Leukozyten, leeres Histogramm = LEW-spezifische NDS-60<sup>pos</sup> Leukozyten.

Tab. 10.6: Durchflusszytometrische Analyse der spezifischen Rattenstamm MHC Klasse-I Moleküle von intrahepatischen Leukozyten nicht-transplantierte LEW- und DA-Lebern sowie von spontantoleranten LEW-Lebern 3, 30 und 100 Tage p.op. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von je drei Messungen.

Leber	Lewis	DA	Lewis	Lewis	Lewis
Tage post op	--	--	3	30	100
<b>DA MHC-I (RT1<sup>avl</sup>)</b> <i>MN-4-91-6 [%]</i>	--	98,4 ± 0,6	68,2 ± 39,6	97,1 ± 1,7	97,6 ± 0,9
<b>LEW MHC-I (RT1<sup>l</sup>)</b> <i>NDS 60 [%]</i>	99,1 ± 0,2	--	5,5 ± 0,9	2,7 ± 1,7	2,2 ± 0,4

*Dynamischer Verlauf intrahepatischer CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> T-Lymphozyten nach Lebertransplantation*

In vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe wurden gezeigt, dass das LEW-Lebertransplantat spontantoleranter DA-Lebern von immunkompetenten Zellen des Empfängers massiv infiltriert wird und dass die im Infiltrat vorhandenen T-Zell Subpopulationen CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>pos</sup> einen dynamischen Verlauf aufweisen (Abb. 10.3; Tab. 10.7). Aufgrund dieser Daten wurden die Analysezeitpunkte für diese Arbeit auf Tag 3 für die Frühphase nach Transplantation und Tag 30 für die Spätphase nach Transplantation festgelegt.

Tab. 10.7: Das Verhältnis intrahepatischer CD45RC<sup>neg</sup> zu CD45RC<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus spontantoleranten Lebertransplantaten im zeitlichen Verlauf nach Lebertransplantation. Ko = Kontrollgruppe, nicht-transplantierte DA-Lebern. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der durchflusszytometrischen Analysen von mindestens drei Zellisolierungen pro Zeitpunkt.

Verhältnis CD45RC <sup>neg</sup> / CD45RC <sup>pos</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten			
Ko	Tag 3	Tag 30	Tag 100
1 / 2 ± 0,1	4,7 / 1 ± 0,8	1,7 / 1 ± 0,4	1 / 1,1 ± 0,2

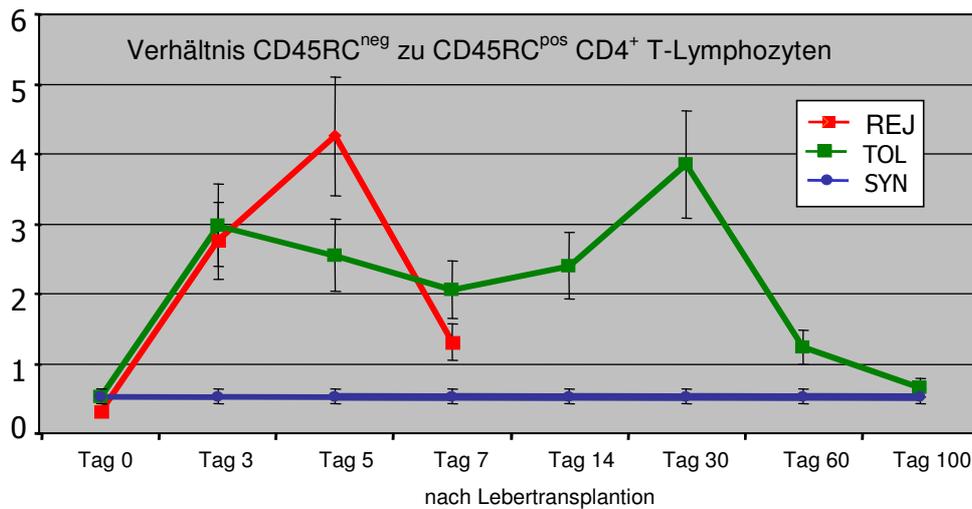


Abb. 10.3: Verhältnis der intrahepatischen CD45RC<sup>neg</sup> zu CD45RC<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf nach Lebertransplantation. TOL-Gruppe = LEW-nach-DA, SYN = DA-nach-DA, REJ = DA-nach-LEW. In der REJ-Gruppe wurden die Versuche an Tag 7 aufgrund des eindeutigen klinischen Bildes der Transplantatabstoßung beendet. (Durchflusszytometrische Analysen: Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei Tieren pro Gruppe). (Kauczok J, 2005).

### *Antigenspezifische Toleranz*

Lebertransplantationen, die in der allogenen Ratten-Stammkombination LEW-nach-DA durchgeführt werden führen zur Spontantoleranz des Transplantates. Dieses Phänomen zeigt sich ausschließlich nach Lebertransplantation und in der erwähnten Stammkombination auch nur in dieser Transplantationsrichtung. Ein charakteristisches Merkmal der Spontantoleranz nach Lebertransplantation ist, dass der DA-Empfänger eine Nichtreaktivität gegenüber LEW-Antigenen ausbildet, jedoch gegenüber allogenen Antigenen anderer Spendertiere immunreaktiv bleibt. Mit anderen Worten, folgt der Lebertransplantation eine Herztransplantation von einem LEW-Spender, so wird das Herztransplantat ebenfalls toleriert. Wird hingegen eine Leber oder ein Herz von einer Wistar Furth Ratte (MHC Haplotyp RT1<sup>u</sup>) dem spontantoleranten DA-Tier transplantiert folgt eine akute Abstoßung. Diese selektive Nichtreaktivität gegen ein bestimmtes allogenes Antigen (hier MHC Haplotyp RT1<sup>l</sup>) bezeichnet man als antigenspezifische Toleranz. Sie konnte in einer Versuchsreihe, bei der

langzeitüberlebende DA-Tieren 100 Tage nach der Lebertransplantation zusätzlich ein Herz in heterotope Lage verpflanzt bekommen nachgewiesen werden (Tab. 4.1). Diese Ergebnisse wurden durch eine weitere Versuchsserie untermauert. Hierbei erhielten lebertransplantierte DA-Tiere der TOL-Gruppe jeweils ein 1 cm<sup>2</sup> großes Hautareal von LEW - und von WF-Ratten. Es zeigte sich, dass nur die LEW-Haut ohne immunsuppressive Therapie einwuchs.

Die antigenspezifische Toleranz konnte bereits 1972 durch R. Calne bei einer kombinierten Transplantation von Leber und Niere sowie von Leber und Pankreas gezeigt werden. Hierbei wurde für das Nieren- bzw. Pankreastransplantat eine geringere immunsuppressive Dosierung benötigt als bei der Einzeltransplantation des jeweiligen Organs (Calne R et al., 1972; Rasmussen A et al., 1995). Dieser „Schutzeffekt“ des Lebertransplantates auf mittransplantierte Organe ist auch für den sehr immunogenen Dünndarm beschrieben (u.a. Meyer D et al., 2002). Sogar bereits ablaufende Abstoßungsreaktionen können durch das Lebertransplantat rückgängig gemacht werden (Kamada N, Wight DGD, 1984; Wang C et al., 1998).

*In vitro* Stimulation von Leber- und Milzleukozyten

Im folgenden Abschnitt sind ergänzend zu Kapitel 4.3.3 die durchflusszytometrischen Analysen der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten spontantoleranter LEW-Lebern tabellarisch aufgeführt. Gemessen wurde die Expressionsstärke der Aktivierungsparameter CD45RC, IL-2R und die Zellgröße an Tag 3 und Tag 30 nach Transplantation (Tab. 3.1).

Tab. 10.8 Durchflusszytometrische Analyse intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus transplantierten LEW-Lebern nach *in vitro* Stimulierung mit den monoklonalen Antikörpern R73 und JJ319 für 16 Stunden. Die Zellen wurden 3 Tage (A) bzw. 30 Tage (B) nach Lebertransplantation isoliert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Verteilung der einzelnen Parameter der W3/25-positiven Populationen von jeweils drei Isolierungen.

<b>A) CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus spontantoleranten Lebern (Tag 3)</b>					
	<b>Frisch isoliert</b>		<b>Inkubation <i>in vitro</i></b>		
	<b>Zum Zeitpunkt der Isolierung</b>	<b>Nicht-Stimuliert 16 Stunden</b>	<b>Stimuliert 3 Stunden</b>	<b>Stimuliert 8 Stunden</b>	<b>Stimuliert 16 Stunden</b>
<b>CD45RC</b> <i>Ox-22<sup>pos</sup></i>	22,9 ± 5,0	38,6 ± 1,6	42,9 ± 18,4	42,9 ± 11,6	63,5 ± 14,7
<b>CD25</b> <i>Ox-39<sup>pos</sup></i>	45,7 ± 4,7	29,6 ± 5,2	77,4 ± 8,8	77,0 ± 6,0	81,4 ± 13,3
<b>Blasten</b> <i>FSC<sup>pos</sup></i>	55,0 ± 3,8	30,2 ± 9,7	44,0 ± 12,0	55,7 ± 17,7	54,3 ± 16,0

<b>B) CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus spontantoleranten Lebern (Tag 30)</b>					
	<b>Frisch isoliert</b>		<b>Inkubation <i>in vitro</i></b>		
	<b>Zum Zeitpunkt der Isolierung</b>	<b>Nicht-Stimuliert 16 Stunden</b>	<b>Stimuliert 3 Stunden</b>	<b>Stimuliert 8 Stunden</b>	<b>Stimuliert 16 Stunden</b>
<b>CD45RC</b> <i>Ox-22<sup>pos</sup></i>	38,5 ± 5,6	43,7 ± 6,5	71,5 ± 5,9	74,7 ± 7,7	71,9 ± 7,4
<b>CD25</b> <i>Ox-39<sup>pos</sup></i>	17,1 ± 5,8	19,0 ± 4,6	77,0 ± 3,3	78,8 ± 4,5	82,7 ± 1,6
<b>Blasten</b> <i>FSC<sup>pos</sup></i>	19,5 ± 3,1	11,2 ± 4,1	20,8 ± 3,9	18,6 ± 5,3	27,7 ± 7,1

Die *in vitro* Stimulation wurde auch an naiven Milzleukozyten und an Milzleukozyten aus lebertransplantierten spontantoleranten DA-Ratten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den intrahepatischen Leukozyten und weisen ebenfalls die starke, unerwartete Zunahme der CD45RC<sup>pos</sup> Zellen nach Stimulation mit den monoklonalen Antikörpern R73 und JJ319 auf (Tab. 10.9 und Tab. 10.10).

Tab. 10.9: durchflusszytometrische Analyse CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus Milzen nicht-transplantierte DA-Ratten vor und nach *in vitro* Stimulierung mit den monoklonalen Antikörpern R73 und JJ319 für 16 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Verteilung der einzelnen Parameter der W3/25<sup>pos</sup> Populationen von jeweils drei Isolierungen.

Naive CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten der Milz					
	Frisch isoliert		Inkubation <i>in vitro</i>		
	Zum Zeitpunkt der Isolierung	Nicht-Stimuliert 16 Stunden	Stimuliert 3 Stunden	Stimuliert 8 Stunden	Stimuliert 16 Stunden
<b>CD45RC</b> Ox-22 <sup>pos</sup>	60,9 ± 2,8	63,0 ± 4,5	85,1 ± 5,9	87,4 ± 4,9	86,9 ± 2,8
<b>CD25</b> Ox-39 <sup>pos</sup>	10,6 ± 0,8	9,5 ± 1,2	81,2 ± 5,3	83,0 ± 3,0	73,0 ± 6,2
<b>Blasten</b> FSC <sup>pos</sup>	7,0 ± 1,6	4,2 ± 0,5	9,4 ± 0,7	12,7 ± 0,9	21,6 ± 4,5

Tab. 10.10 durchflusszytometrische Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus Milzen von lebertransplantierten DA-Tieren der Spontantoleranzgruppe nach *in vitro* Stimulierung mit den monoklonalen Antikörpern R73 und JJ319 für 16 Stunden. Die Zellen wurden 3 Tage (A) bzw. 30 Tage (B) nach Lebertransplantation isoliert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Verteilung der einzelnen Parameter der W3/25<sup>pos</sup> Populationen von jeweils drei Isolierungen.

<b>A) CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Milz (Tag 3)</b>					
	<b>Frisch isoliert</b>		<b>Inkubation <i>in vitro</i></b>		
	<b>Zum Zeitpunkt der Isolierung</b>	<b>Nicht-Stimuliert 16 Stunden</b>	<b>Stimuliert 3 Stunden</b>	<b>Stimuliert 8 Stunden</b>	<b>Stimuliert 16 Stunden</b>
<b>CD45RC</b> <i>Ox-22<sup>pos</sup></i>	51,7 ± 7,4	40,7 ± 3,6	72,2 ± 12,6	82,1 ± 4,9	85,1 ± 4,3
<b>CD25</b> <i>Ox-39<sup>pos</sup></i>	13,8 ± 1,6	11,3 ± 2,8	75,0 ± 15,0	85,2 ± 5,3	86,3 ± 10,0
<b>Blasten</b> <i>FSC<sup>pos</sup></i>	12,0 ± 6,3	4,3 ± 1,7	11,3 ± 2,0	13,6 ± 3,2	22,4 ± 4,6

<b>B) CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Milz (Tag 30)</b>					
	<b>Frisch isoliert</b>		<b>Inkubation <i>in vitro</i></b>		
	<b>Zum Zeitpunkt der Isolierung</b>	<b>Nicht-Stimuliert 16 Stunden</b>	<b>Stimuliert 3 Stunden</b>	<b>Stimuliert 8 Stunden</b>	<b>Stimuliert 16 Stunden</b>
<b>CD45RC</b> <i>Ox-22<sup>pos</sup></i>	54,6 ± 0,2	64,7 ± 2,2	85,9 ± 4,1	85,5 ± 2,2	90,3 ± 3,9
<b>CD25</b> <i>Ox-39<sup>pos</sup></i>	9,0 ± 0,2	10,0 ± 0,2	86,8 ± 1,4	85,2 ± 2,5	86,1 ± 1,8
<b>Blasten</b> <i>FSC<sup>pos</sup></i>	8,6 ± 1,0	3,9 ± 0,5	9,0 ± 0,3	14,9 ± 4,1	39,8 ± 4,4

### A.3 Durchflusszytometrische Diagramme

Zum besseren Verständnis der im Kapitel 4.3 aufgeführten Ergebnisse werden im Folgenden die grafischen Auswertungen der durchflusszytometrischen Analysen dargestellt. Ausschließlich in Abb. 10.4 A sind alle gemessenen Ereignisse der Analyseprobe abgebildet, die unmittelbar nach Isolierung der intrahepatischen Leukozyten aus der Leber detektiert wurden. Alle weiteren Abbildungen zeigen nur die in Region 1 befindlichen Ereignisse. Dementsprechend sind auch die prozentualen Anteile der Zellpopulationen Anteile von Region 1 und nicht von allen gemessenen Ereignissen. Eine Analyse wurde nach 10.000 gezählten Ereignissen gestoppt.

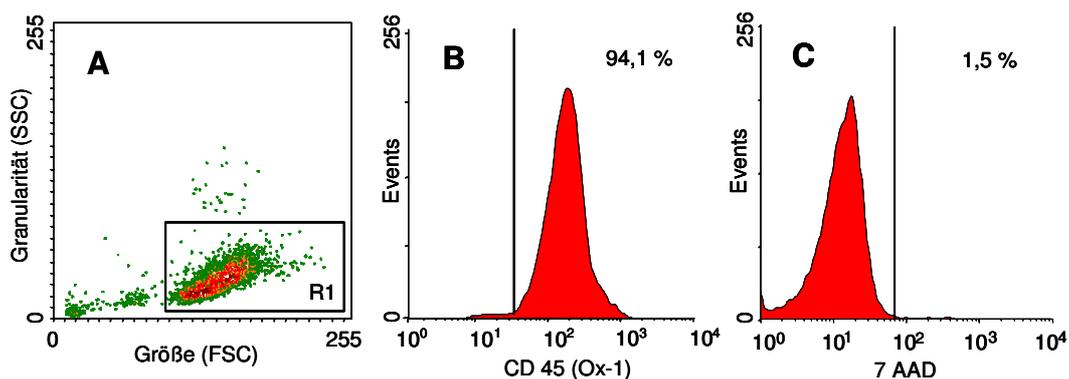


Abb. 10.4: Durchflusszytometrische Analyse der isolierten intrahepatische Leukozyten: A= Entsprechend Größe und Granularität lassen sich mehrere Populationen voneinander abgrenzen. Die Ereignisse in Region 1 sind wie die Histogramme B und C zeigen zu über 95% vitale Leukozyten. Die Ereignisse außerhalb R1 sind Gewebedetritus und avitale Leukozyten.

FACS-Konturen-Diagramme wurden ausschließlich bei Analysen der Größe und Granularität, sowie Analysen von Zellpopulationen, welche mit zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern markiert wurden genutzt. Histogramme hingegen wurden zur Darstellung der Analysen in denen nur ein Parameter gemessen wurde genutzt.

### MHC Moleküle

Die MHC Moleküle lassen sich in zwei große Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe wird von den Genen des Nebenhistokompatibilitätskomplexes („minor histocompatibility complex“) kodiert und auch mit MHC Klasse-I bezeichnet. Sie werden von allen Zellen eines Organismus exprimiert. Die für die Transplantationsmedizin weitaus wichtigere Gruppe, die MHC Klasse-II Moleküle werden von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes („major histocompatibility complex“) kodiert. Diese Oberflächenmoleküle sind auf Antigenpräsentierenden Zellen vertreten. Sie führen bei Organtransplantationen zwischen genetisch nicht identischen Individuen zur akuten Abstoßungsreaktion. In Abb. 10.5 ist die Expressionstärke der MHC Klasse-I und II Moleküle intrahepatischer Leukozyten einer DA-Leber gezeigt.

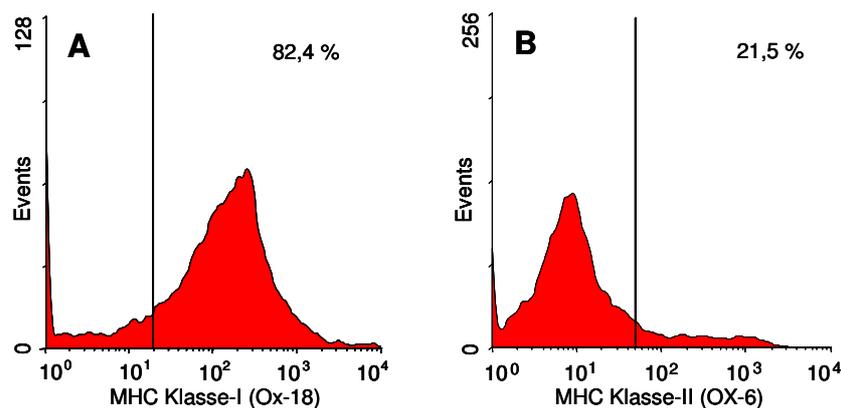


Abb. 10.5: Durchflusszytometrische Analysen intrahepatischer Leukozyten: Die Zellen exprimieren zu ca. 80% MHC Klasse-I. Als MHC Klasse-II Träger mit über 48% aller intrahepatischen Leukozyten sind die „passenger leukocytes“ ein starker Antigenstimulus, welcher nach Lebertransplantation die immunologische Reaktion einleitet.

### T-Lymphozyten

Abb. 10.6 zeigt, dass die Wahl, mit welchem Fluoreszenzmolekül (FITC vs. PE) der Färbeantikörper konjugiert ist, Einfluss auf die Analyse nimmt. Für die Hauptversuche wurden zur Analyse der  $CD4^+$  T-Lymphozyten die Antikörperkombinationen W3/25 FITC und R73 PE und für die  $CD8^+$  T-Lymphozyten die Kombination Ox-8 FITC und R73 PE (Abb. 10.7) genutzt.

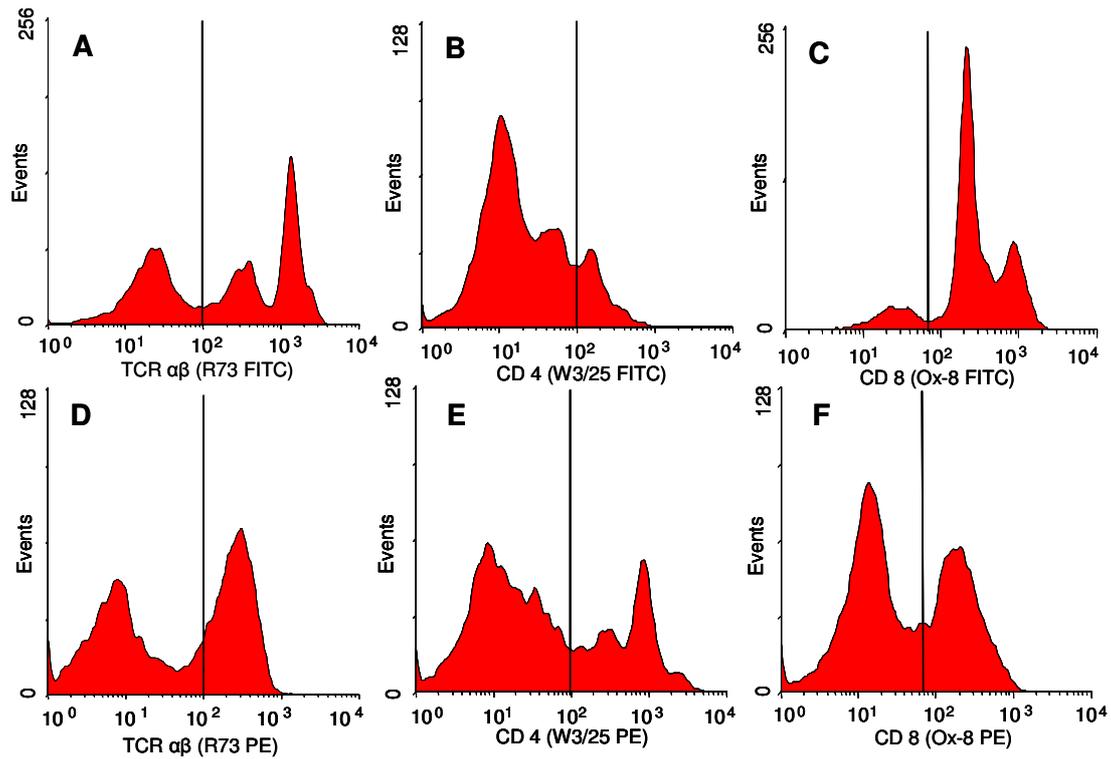


Abb. 10.6: Durchflusszytometrische Analysen intrahepatischer T-Lymphozyten: A-C Antikörper mit FITC-konjugiert. D-F Antikörper mit PE-konjugiert. A,D = T-Zell-Rezeptor. B,E = CD4 Molekül. C,F  $\alpha$ -Kette des CD8 Moleküls.

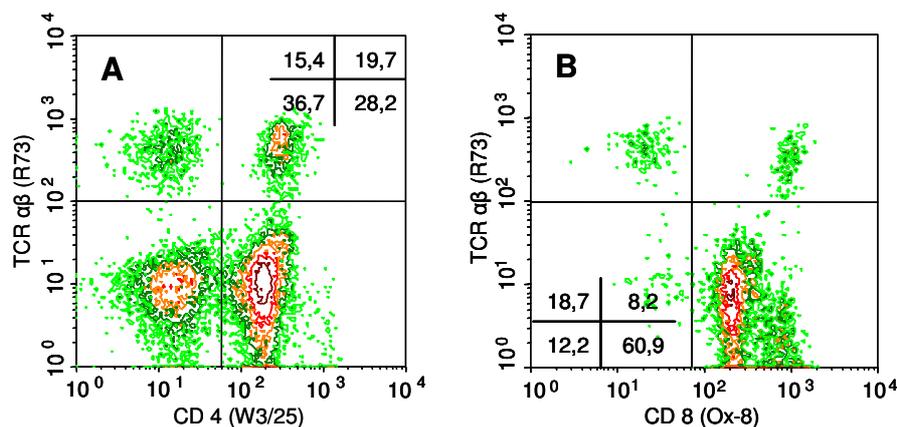


Abb. 10.7: Durchflusszytometrische Analysen intrahepatischer CD4<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup> (B) T-Lymphozyten. Die Zahlenwerte sind prozentuale Angaben der dargestellten Subpopulationen einer Messung. Mittelwert und Standardabweichung der Messungen sind in Tab. 10.2 angegeben.

### Subpopulationen der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die durchflusszytometrische Analyse der CD45RC Subpopulationen der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Isolierte intrahepatische Leukozyten und Milzleukozyten von DA und LEW-Ratten wurden mit Hilfe der monoklonalen Antikörpern W3/25 und Ox-22 in die in Abb. 10.8 gezeigten Subpopulation unterteilt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist können nicht nur Färbeantikörper-negative und Färbeantikörper-positive Zellen, sondern auch intermediate und hochpositive Zellen differenziert werden.

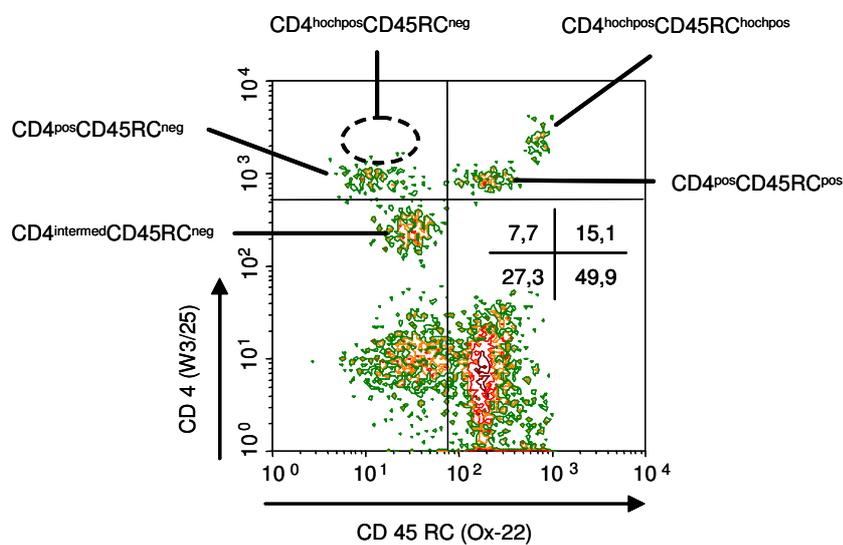


Abb. 10.8: Durchflusszytometrische Analysen intrahepatischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Die Zahlenwerte sind prozentuale Angaben der dargestellten Subpopulationen einer Messung. Mittelwert und Standardabweichung der Messungen sowie die differenzierten Angaben zu den hochpositiven und intermediaten Zellpopulationen sind in Tab. 10.2 angegeben.

Als weiterer Aktivierungsparameter diente die Expressionsstärke des IL-2 Rezeptor-Moleküls (CD25) (Abb. 10.11 A).

Zur Analyse naiver CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die erst kürzlich den Thymus verlassen haben wurden die Antikörper W3/25 und Ox-7 (CD90) genutzt. Auch hierbei lässt sich eine W3/35<sup>hochpos</sup> Lymphozytenpopulation abgrenzen (Abb. 10.9).

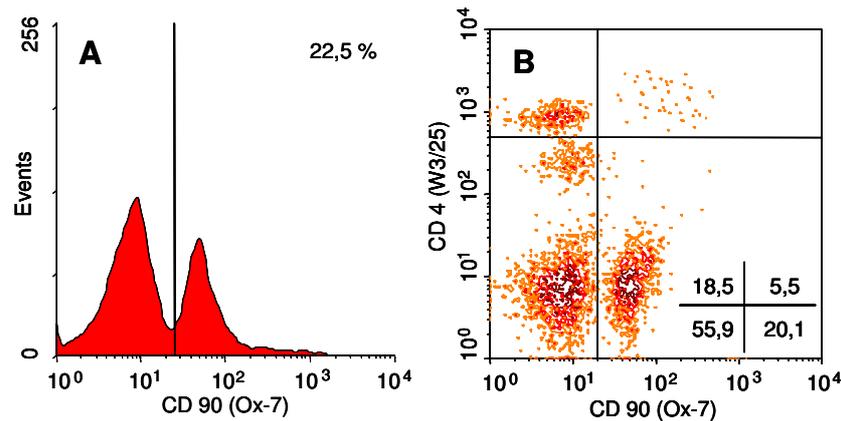


Abb. 10.9 Durchflusszytometrische Analysen naiver CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die erst kürzlich den Thymus verlassen haben. A: Histogramm der CD90<sup>pos</sup> intrahepatischen Leukozyten. B: Differenzierung der CD90<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> intrahepatischen Lymphozyten. Die Zahlenwerte sind prozentuale Angaben der dargestellten Subpopulationen einer Messung. Mittelwert und Standardabweichung der Messungen sind in Tab. 10.2 angegeben.

Ergänzend zu den Ergebnissen aus Kapitel 4.3.3 zeigen die Abb. 10.10 und Abb. 10.11 das Expressionsmuster der Aktivierungsparameter CD45RC und IL-2R (CD25) nach *in vitro* Inkubation ohne und mit vorheriger Stimulation durch die monoklonalen Antikörper R73 und JJ319.

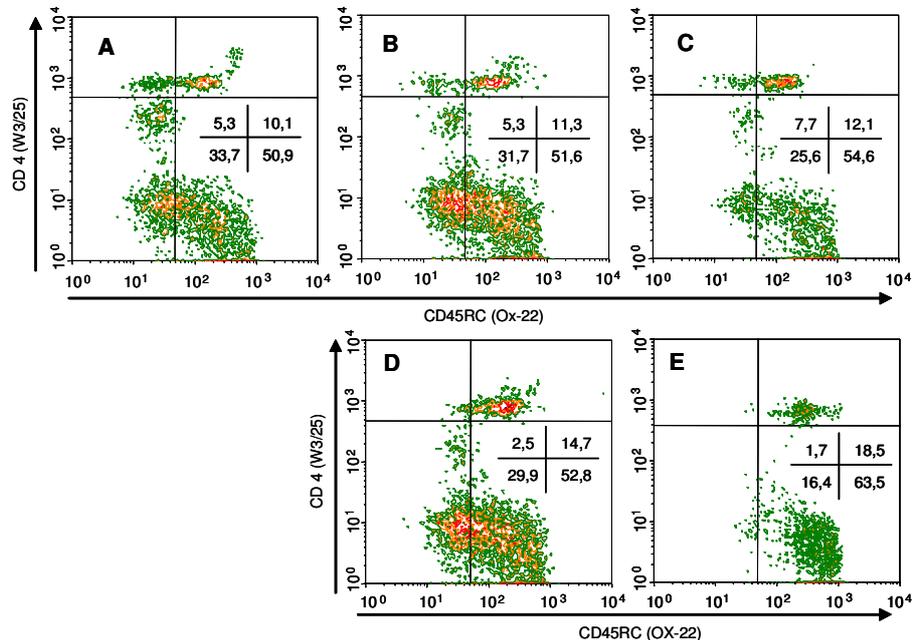


Abb. 10.10 Durchflusszytometrische Analysen der Expressionsstärke der CD4 und CD45RC Moleküle intrahepatischer Leukozyten aus nicht-transplantierten DA-Lebern. A: unmittelbar nach Isolation. B, C: nach Isolation und Inkubation in RPMI 1640 für 3 bzw. 16 Stunden ohne Stimulation. D, E: nach Isolation und *in vitro* Stimulation mit den monoklonalen Antikörpern R73 und JJ319 für 3 bzw. 16 Stunden. Die Zahlenwerte sind prozentuale Anteile aller Zählereignisse aus der Leukozytenregion R1 und sind den jeweiligen Quadranten in den einzelnen Diagrammen zuzuordnen.

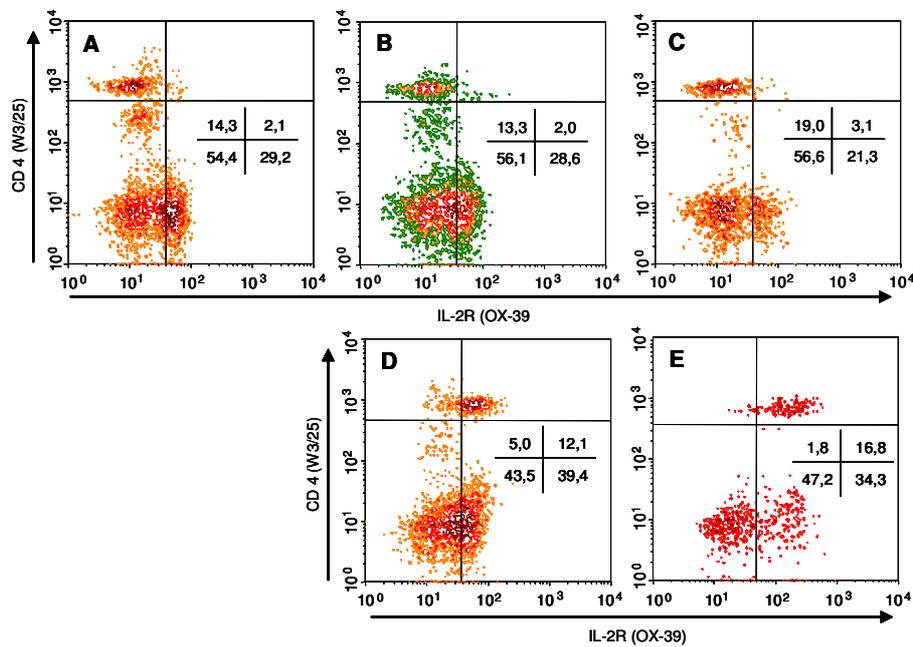


Abb. 10.11 Durchflusszytometrische Analysen der CD4 und IL-2R Expression intrahepatischer Leukozyten aus nicht-transplantierten DA-Lebern. A: unmittelbar nach Isolation. B, C: nach Isolation und Inkubation in RPMI 1640 für 3 bzw. 16 Stunden ohne Stimulation. D, E: nach Isolation und *in vitro* Stimulation mit den monoklonalen Antikörpern R73 und JJ319 für 3 bzw. 16 Stunden. Die Zahlenwerte sind prozentuale Anteile aller Zählereignisse aus der Leukozytenregion R1 und sind den jeweiligen Quadranten in den einzelnen Diagrammen zuzuordnen

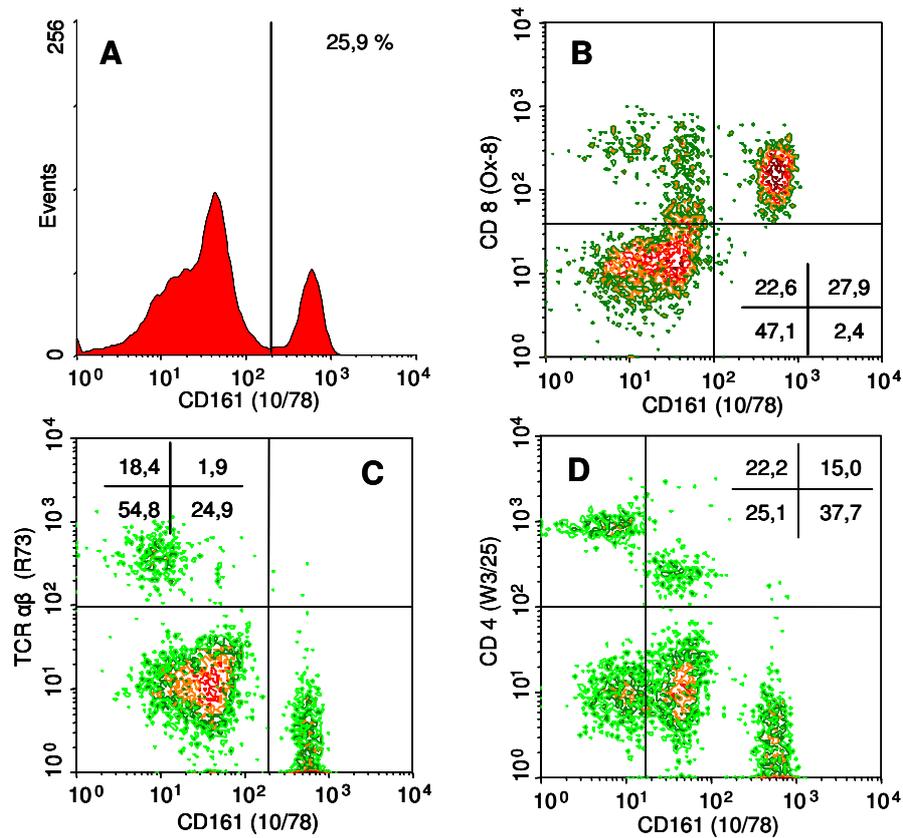


Abb. 10.12: Durchflusszytometrische Analysen der intrahepatischen NK-Zellen einer nicht transplantierten DA-Leber. Zur Darstellung wurden die isolierten Leukozyten mit dem Antikörper 10/78, der spezifisch für NK-Zellen an das Oberflächenepitop CD161 bindet konjugiert (A). Über eine Gegenfärbung mit dem Antikörper Ox-8 konnten die NK-Zellen im Konturendiagramm weiter spezifiziert werden (B). Wie erwartet exprimieren die NK-Zellen keinen T-Zell Rezeptor (C). Die Zahlenwerte sind prozentuale Angaben der dargestellten Subpopulationen einer Messung. Mittelwert und Standardabweichung der Messungen sind in Tab. 10.2 angegeben.

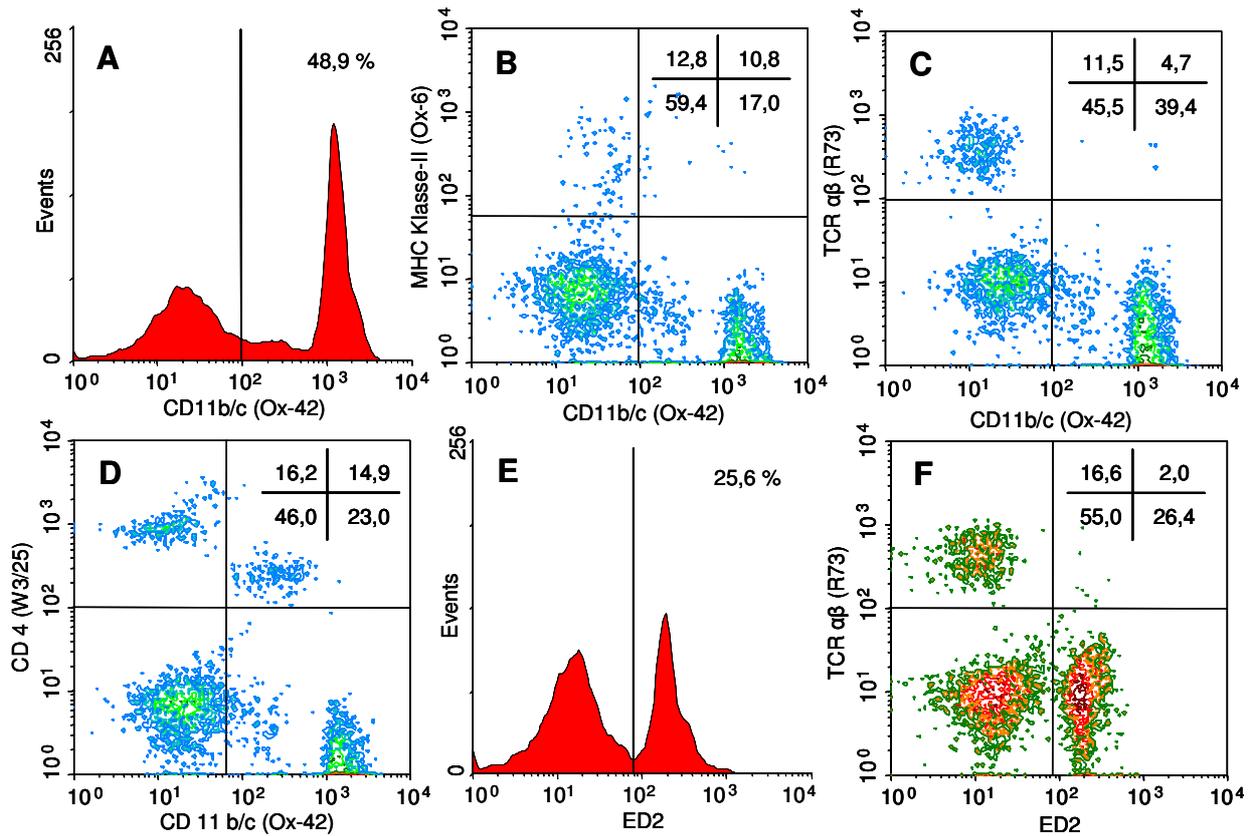


Abb. 10.13: Durchflusszytometrische Analysen der intrahepatischen Makrophagen einer nicht transplantierten DA-Leber. A: Darstellung der Makrophagen durch Konjugation der Zellen mit dem Antikörper Ox-42 spezifisch für das Oberflächenepitop CD11b/c. B, C: Wie erwartet waren die Makrophagen sowohl MHC Klasse-II und TCR  $\alpha\beta$  negativ. In Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper W3/25 zeigt sich ein Teil der Zellen als  $CD4^{\text{intermed}}CD11b/c^{\text{pos}}$ . E, F: ED2 ist ein weiterer Antikörper, welcher an Membranantigene von Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen bindet und über den die intrahepatischen Makrophagen dargestellt werden können. Die Zahlenwerte sind prozentuale Angaben der dargestellten Subpopulationen einer Messung. Mittelwert und Standardabweichung der Messungen sind in Tab. 10.2 angegeben.

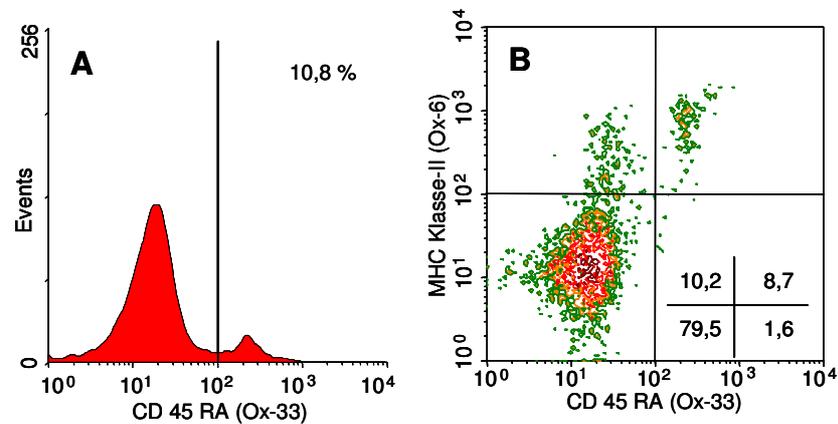


Abb. 10.14: Durchflusszytometrische Analysen der intrahepatischen B-Lymphozyten einer nicht transplantierten DA-Leber. Zur Darstellung wurden die isolierten Leukozyten mit dem Antikörper Ox-33 in Gegenfärbung mit dem Antikörper Ox-6 konjugiert und so die B-Lymphozyten über die Oberflächenmoleküle MHC Klasse-II und CD45RA gekennzeichnet. Die Zahlenwerte sind prozentuale Angaben der dargestellten Subpopulationen einer Messung. Mittelwert und Standardabweichung der Messungen sind in Tab. 10.2 angegeben.

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Experimentellen Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Klinik I der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Christoph Otto durchgeführt. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede, Direktor der Klinik, bedanken.

Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantationsimmunologie, danke ich für die Schaffung der hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die wertvollen Hinweise zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Christoph Otto, Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantationsimmunologie der Universität Würzburg, für die Überlassung des Themas und die hervorragende Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Die anregenden Diskussionen zu vielfältigen immunologischen Problemen, seine Geduld und nicht zuletzt seine moralische Unterstützung hatten maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau N. Martens und J. Grimmer, Technische Assistentinnen in der Experimentellen Transplantationsimmunologie, und bei Frau S. Rotzoll, Institut für Virologie und Immunologie der Universität Würzburg, für ihre großartige Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Versuche. Dank gebührt ebenfalls Frau A. Prappacher, Tierpflegerin in der Experimentellen Transplantationsimmunologie. Besondere Anerkennung gebührt ihnen allen für das sehr angenehme Arbeitsklima.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, Frau Margarete M. Schmitz und Herrn Rudolf P. Schmitz, sowie meinem Bruder, Sam I. Schmitz, ohne die das Studium der Humanmedizin und die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Frau Sabine Schmitz, Assistenzärztin der Kinder und Jugendpsychiatrie der Universitätsklinik Würzburg für ihre liebevolle und moralische Unterstützung während unserer gemeinsamen Studienzeiten.

---

## Lebenslauf

### Paul Schmitz

---

Geburtstag/ -ort: 06.10.1972 in Leverkusen  
Nationalität: deutsch  
Ehefrau: Sabine Schmitz (geb. Kautz), Ärztin

#### **Beruf**

Arzt und Staatlich examinierter Rettungsassistent  
Aktuelle Tätigkeit: Assistenzarzt der Unfallchirurgie  
Krankenhaus Barmherzige Brüder - Regensburg

#### **Schulbildung**

1979 – 1983 Grundschole - Birgel / Düren  
1983 – 1984 Hauptschole - Kleinhau / Hürtgenwald  
1984 – 1993 Stifftisches Gymnasium am Altenteich - Düren;  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife / Abitur

#### **Hochschulstudium an der Julius Maximilians Universität Würzburg**

1998 – 2000 Vorklinisches Studium  
2000 – 2004 Klinisches Studium  
2004 – 2005 Praktisches Jahr: Innere Medizin (Klinikum Coburg), Orthopädie (König Ludwig Haus - Würzburg), Chirurgie (Med. Universität - Ho Chi Minh Stadt - Vietnam)

#### **Zivildienst und studienbegleitende Tätigkeit**

1993 – 1994 Arbeiter-Samariter-Bund - Düren; Mobiler Sozialer Hilfsdienst  
1998 – 2003 Rettungsdienst: Bayerisches Rotes Kreuz – Würzburg  
Famulaturen: Allgemeinmedizin (Dr. G. Kautz - Meiningen), Kinderchirurgie (Universitäts-Klinik - Würzburg), Gynäkologie und Geburtshilfe (St. Elisabeth Krankenhaus – Bonn), Innere Medizin und Tropenmedizin (Tetteh Quarshie Memorial Hospital – Ghana)

#### **Stipendien**

Vereinte Stipendien- und Preisstiftung der Universität Würzburg  
Oskar-Karl-Forster Stiftung  
GlaxoSmithKline Stiftung

---

## Publikationen

*Immunologische Toleranz nach Lebertransplantation: Entwicklung einer Interleukin-13 produzierenden, intrahepatischen CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozytenpopulation*

**P. Schmitz, C. Otto, J. Kauczok, K. Ulrichs, H.-J. Gassel** Präsentation (Vortrag):

79. Tagung der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V., 18. – 20. Juli 2002, Schweinfurt, Deutschland

*The Presence of an Interleukin 13 Producing Intrahepatic CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup> T cell Population correlates with Liver Tolerance*

**H.-J Gassel, P.Schmitz, J. Kauczok, J. Grimmer, U. Steger, W. Timmermann, K. Ulrichs, C. Otto.** Präsentation (Poster): XIX International Congress of The

Transplantation Society, 25. – 30.08.2002, Miami, USA

*Die Präsenz Interleukin-13 produzierender intrahepatischer CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>neg</sup> T-Lymphozyten korreliert mit immunologischer Toleranz nach Lebertransplantation*

**P.Schmitz, C.Otto, K.Ulrichs, A.Thiede, H.-J.Gassel.** Präsentation (Poster): 13.

Workshop für experimentelle und klinische Lebertransplantation und Hepatologie, 20. – 22. Juni 2002, Wilsede, Deutschland

*Mechanism of Immunological Tolerance after Rat Liver Transplantation: Development of an Intrahepatic CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup> T cell Population Producing Interleukin-13 in Response to Stimulation*

**P.Schmitz, C.Otto, J. Kauczok, N. Martens, J. Grimmer, K.Ulrichs, H.-J.Gassel. Präsentation** (Poster): International Symposium: Molecular Mechanisms of

Pathogenesis, 11. – 13. April 2002, Würzburg, Deutschland