

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne))

Untersuchungen zur Funktion von Zellen mit NK-Rezeptoren bei der Abstoßung allogener Herztransplantate durch CD28-defiziente Mäuse

Christine Muriel Tertilt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. K. D. Pfeffer
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker
3. Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel

Die Dissertation wurde am 29.11.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 08.05.2002 angenommen.

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I-IV
Abbildungsverzeichnis	V-VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII-IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Angeborene Immunität	2
1.1.1 Pathogen-assoziierte molekulare Muster	3
1.1.2 Pattern-Recognition-Rezeptoren	4
1.1.3 Kommunikation zwischen natürlichem und adaptiven Immunsystem am Beispiel von Toll-like-Rezeptoren	4
1.1.4 Erkennung der Abwesenheit von Selbst	6
1.1.4.1 Natürliche Killerzellen und "Missing Self"	7
1.1.4.2 Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren	9
1.1.5 Regulation natürlicher Killerzellen durch Integration aktivierender und inhibitorischer Signale	11
1.2 Adaptive Immunität und Kostimulation	14
1.2.1 Struktur und Expressionsmuster des Kostimulationsmoleküls CD28 und seiner Liganden	15
1.2.2 Effekte von CD28-Kostimulation in der T-Zell-Aktivierung	18
1.2.3 Anergie	20
1.2.4 Generierung eines CD28-defizienten Mausstamms	20
1.2.5 Beeinträchtigung der T-Zell-Aktivierung in Abwesenheit von CD28	21
1.2.6 CTLA-4: Ein Bindungspartner von B7-1/B7-2 mit inhibitorischer Funktion	22
1.3 Transplantation	23
1.3.1 Mechanismen der Transplantatabstoßung	24
1.3.2 Überblick über immunsuppressive Therapiemöglichkeiten in der Transplantationsmedizin	26
1.3.2.1 Chemotherapeutische Immunsuppression	26
1.3.2.2 Immunsuppression durch Antikörper	28
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	31

3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	Bezugsquellennachweis	33
3.1.1	Versuchstiere	33
3.1.2	Chemikalien	34
3.1.3	Radiochemikalien	35
3.1.4	Enzyme	35
3.1.5	Reagenzien und Verbrauchsmaterial	35
3.1.6	Geräte	36
3.2	Primer und Kontrollfragmente	37
3.3	Antikörper und Zweitreagenzien	38
3.4	Puffer und Medien	39
3.4.1	Stammlösungen und Puffer	39
3.4.2	Medium für die Bakterienkultur	40
3.4.3	Medium für die Isolierung mononukleärer Zellen	41
3.5	Heterotope Herztransplantation in der Maus	41
3.6	Histologie und Immunhistochemie	42
3.6.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	42
3.6.2	Konventionelle Färbung mit Hämatoxylin/Eosin	42
3.6.3	Immunhistochemie	43
3.7	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	45
3.7.1	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.7.1.1	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	45
3.7.1.2	Präparative Agarose-Gelelektrophorese	45
3.7.1.3	Bestimmung von Fragmentgrößen	46
3.7.2	Isolierung von Plasmid-DNS	46
3.7.3	Restriktionsverdau	46
3.7.4	Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebe	47
3.7.5	RNase Protection-Assay	49
3.7.6	Semiquantitative RT-PCR	50
3.7.6.1	cDNS-Synthese	50
3.7.6.2	Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR	51
3.7.6.3	Kompetitive semiquantitative RT-PCR	52
3.8	Zellbiologische Methoden	54
3.8.1	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Milz und Blut	54
3.8.2	Erythrozyten-Lyse	54

3.8.3	Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Herztransplantaten durch Kollagenase-Verdau	54
3.8.4	Isolierung mononukleärer Zellen durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation	55
3.9	Immunfluoreszenzanalyse	57
3.9.1	Durchflußzytometrie	57
3.9.2	Mehrfarbenfluoreszenzanalyse	57
3.10	<i>In vivo</i> Depletion von NK1.1 positiven Zellen	58
4	ERGEBNISSE	59
4.1	Allogene Herztransplantate in CD28^{-/-} Empfängern zeigen ein aggressives leukozytäres Infiltrat	59
4.2	CD28-Defizienz führt zur Reduktion der Infiltration von CD4⁺ T-Zellen in allogene Herztransplantate	59
4.3	NK- und NK-T-Zellen infiltrieren allogene Herztransplantate	63
4.4	Semiallogene Herztransplantate werden von CD28-defizienten Empfängern akzeptiert	67
4.4.1	CD28-Defizienz führt bei semiallogener Transplantation zur Reduktion der Infiltration von CD8 ⁺ T-Zellen	67
4.4.2	Reduktion der Infiltration von NK und NK-T-Zellen bei Transplantation semiallogener Herzen in CD28 ^{-/-} Mäuse	68
4.5	Untersuchung der Zytokin-Expression in Herztransplantaten mittels RNase Protection-Assay und semiquantitativer RT-PCR	70
4.5.1	Methodische Vorarbeiten	70
4.5.2	Verringerte Transkription inflammatorischer Zytokine in semiallogen in CD28 ^{-/-} Mäuse transplantierten Herzen im Vergleich zu allogen in Wildtypmäuse transplantierten Herzen	70
4.6	Deutlich verlängertes Überleben allogener Herztransplantate durch die <i>in vivo</i> Depletion NK1.1 positiver Zellen in CD28^{-/-} Mäusen	75
4.6.1	Nachweis der effektiven Depletion NK1.1 positiver Zellen durch durchflußzytometrische Analyse von Leukozyten aus peripherem Blut	75
4.6.2	Depletion von NK1.1 positiven Zellen führt zu einem deutlich verlängerten Überleben allogener Herztransplantate in CD28-defizienten, nicht aber in Wildtyp- Mäusen	78
4.6.3	Depletion von NK1.1 positiven Zellen führt zu einer Reduktion des mononukleären Infiltrats in allogenen Herztransplantaten	79

5	DISKUSSION	81
5.1	Transplantatabstoßung in Abwesenheit von Kostimulation und unter Kostimulationsblockade	81
5.2	Kostimulationsabhängigkeit von CD8⁺ T-Zellen	86
5.3	NK-Zellen in der Transplantatabstoßung	89
5.4	Semiallogenes Transplantat: Anwesenheit von Selbst-MHC versus Reduktion von Fremd-MHC	92
5.4.1	Bindung inhibitorischer Rezeptoren durch Selbst-MHC-Klasse-I-Moleküle des Allotyps H-2 ^b auf Transplantatzellen	92
5.4.2	Bedeutung der Stärke des TZR-Signals für die Aktivierung von T-Zellen in An- und Abwesenheit von Kostimulation	94
5.5	<i>In vivo</i> Depletion NK1.1 positiver Zellen	96
5.5.1	<i>In vivo</i> Administration von anti-NK1.1 mAK führt nicht zur unspezifischen Immunsuppression	97
5.5.2	Spezifität der NK-Depletion durch anti-NK1.1	98
5.5.3	Effekte von anti-NK1.1- und anti-Asialo-GM1-Depletion in einem murinen Hauttransplantationsmodell mit kombinierter Kostimulationsblockade	98
5.5.4	NK-T-Zellen	99
5.6	Rolle von NK1.1 positiven Zellen bei der Initiierung und Beeinflussung von adaptiven Immunantworten	104
5.7	Klinische Implikationen der Ergebnisse	105
5.8	Ausblick	106
6	ZUSAMMENFASSUNG	108
7	LITERATURVERZEICHNIS	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Zusammenspiel von natürlicher und adaptiver Immunität	6
Abbildung 1.2: "Missing Self"-Hypothese (Effektor-Inhibitions-Modell)	8
Abbildung 1.3: Regulierung des Aktivitätszustands natürlicher Killerzellen durch aktivierende und inhibitorische Rezeptoren	13
Abbildung 1.4: Das 2-Signale-Modell der T-Zell-Aktivierung (Kostimulation)	16
Abbildung 1.5: Mechanismen der Transplantatabstoßung	25
Abbildung 1.6: Zielstrukturen immunsuppressiver Substanzen	27
Abbildung 2.1: Abstoßung allogener, aber Akzeptanz semiallogener Herztransplantate in CD28-defizienten Empfängern	31
Abbildung 4.1: Immunhistochemische Färbungen von Herztransplantaten.	60
Abbildung 4.2: Durchflußzytometrische Analyse Transplantat infiltrierender Zellen	61
Abbildung 4.3: Quantitative Auswertung unterschiedlicher Transplantat infiltrierender Leukozyten-Populationen	62
Abbildung 4.4: Zusammensetzung Mac-1 α und DX5 exprimierender Populationen in Transplantat infiltrierenden Leukozyten (H-2 ^d \rightarrow H-2 ^b , WT)	64
Abbildung 4.5: Makrophagen, NK und NK-T-Zellen in Herztransplantaten	65
Abbildung 4.6: Quantitative Analyse der Transplantat infiltrierenden Makrophagen, NK- und NK-T-Zellen	66
Abbildung 4.7: Infiltration von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen, Makrophagen, NK- und NK-T-Zellen in semiallogene Transplantate sowie in allogene unter NK-Depletion in CD28 ^{+/+} und CD28 ^{-/-} Empfänger transplantierte Herzen	69
Abbildung 4.8: Verringerte Transkription inflammatorischer Zytokine in semiallogene in CD28-defiziente Mäuse transplantierten Herzen	72
Abbildung 4.9: IFN γ Transkription in Herztransplantaten – semiquantitative RT-PCR.	73
Abbildung 4.10: Untersuchung der Zytokintranskription in Herztransplantaten mittels semiquantitativer RT-PCR und RNase Protection-Assay	74
Abbildung 4.11: NK und NK-T-Zellen in peripherem Blut vor Injektion von mAK PK136 sowie 1 und 4 Tage nach Transplantation	77
Abbildung 4.12: <i>In vivo</i> Depletion NK1.1 positiver Zellen führt in CD28-defizienten Empfängern zu deutlich verlängertem Transplantat-Überleben	78

Abbildung 4.13: Immunhistochemische Färbungen von Herztransplantaten unter <i>in vivo</i> Depletion NK1.1 exprimierender Zellen	79
Abbildung 5.1: Charakteristische Eigenschaften von NK-, T-, und NK-T-Zellen	100
Abbildung 5.2: Modell zur Rolle von NK-/NK-T-Zellen bei der Abstoßung allogener Organtransplantate in der Abwesenheit von CD28-Kostimulation	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Liganden muriner Ly-49-Rezeptoren	10
Tabelle 3.1:	MHC-Genotypen verwendeter Mausstämme	33
Tabelle 3.2:	Verwendete monoklonale Antikörper	38
Tabelle 3.3:	Zusammensetzung der Verdaulösung	54
Tabelle 3.4:	Konjugation und Verdünnung der eingesetzten Antikörper	57
Tabelle 5.1:	Ergebnisse in murinen Herztransplantationsmodellen	84
Tabelle 5.2:	Ergebnisse in murinen Hauttransplantationsmodellen	85
Tabelle 5.3:	Zusammenstellung einiger Charakteristika von peripheren NK-T-Zell- Populationen aus C57BL76-Mäusen	101

Abkürzungsverzeichnis

α -Gal-Cer	Alpha-Galactosyl-Ceramid
AK	Antikörper
APZ	Antigen präsentierende Zelle
β_2 m	Beta-2-Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cDNS	Komplementäre DNS (DNS-Kopie der RNS)
CR	Komplementrezeptor
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
EtOH	Ethanol
FKS	Fötale Kalberserum
h	Stunde(n)
H ₂ O _{bidest}	Zweifach destilliertes oder Milli-Q- (Millipore) Wasser
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	Immunorezeptor Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv
ITIM	Immunorezeptor Tyrosin-basiertes inhibitorisches Motiv
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LT	Lymphotoxin
KIR	<i>Killing inhibitory receptor</i>
M	Mol
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	Major-Histokompatibilitäts-Komplex
Min.	Minuten
mRNS	Boten-RNS
MÜZ	Mittlere Überlebenszeit
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PRR	<i>Pattern-Recognition-Rezeptor</i>
PBS	Phosphat-gepuffertes Salz
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RAG	Rekombination aktivierendes Gen
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SPF	spezifisch Pathogen frei
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus
w/v	Gewicht/ Volumen
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

Im Laufe ihres Lebens müssen sich alle multizellulären Organismen mit potenziell lebensbedrohlichen Infektionen durch eine Vielzahl mikrobieller Erreger auseinandersetzen. Das Überleben des Organismus hängt von der Fähigkeit ab, das Eindringen solcher Erreger zu verhindern und bereits eingedrungene Erreger zu eliminieren. Wie aber kann der Organismus effektive Immunantworten gegen pathogene Erreger generieren und sich gleichzeitig vor Immunantworten gegen sich selbst (Autoimmunität) ebenso wie gegen überschießende Immunantworten gegen harmlose Antigene (Allergie) schützen? Wie lässt sich erklären, welche Strukturen angegriffen und welche Strukturen toleriert werden? Diese Unterscheidung erscheint als vielleicht wichtigste Funktion des Immunsystems überhaupt, und eine fehlende Aktivierung gegen pathogene Erreger kann für den Organismus ebenso deletäre Auswirkungen haben wie eine unzureichende Aktivierung gegen harmlose oder körpereigene Strukturen.

Die Differenzierung zwischen anzugreifenden und zu tolerierenden Strukturen wurde als "self-non-self discrimination", als Unterscheidung zwischen einem "Selbst" und einem "Fremd", das alle Strukturen des restlichen Universums umfasst, beschrieben (Bretscher and Cohn, 1970; Matzinger, 1994). Zellen des adaptiven Immunsystems mit klonotypischen Rezeptoren durchlaufen während ihrer Entwicklung in den primären lymphatischen Organen ein Stadium, in dem Antigenkontakt nicht zu Aktivierung, sondern zu Toleranz führt, so dass selbstreaktive T-Zell-Klone im Thymus (Allen, 1994) ebenso wie autoreaktive B-Zell-Klone im Knochenmark deletiert werden (Burnet, 1957; zur Übersicht: Klinman, 1996). Dieser Mechanismus, der als zentrale Toleranz bezeichnet wird, eliminiert viele der potenziell gefährlichsten Lymphozyten-Klone, nämlich diejenigen mit hochaffinen Rezeptoren gegen ubiquitär exprimierte Selbst-Antigene.

Bei genauerer Betrachtung reicht diese Art der Selbst-Fremd-Unterscheidung zur Erklärung einiger beobachteter Effekte des Immunsystems nicht aus: Tatsächlich greift das Immunsystem nur einen Bruchteil der Nicht-Selbst-Strukturen an. Viele Fremdstrukturen, wie z.B. kommensale Mikroorganismen, Nahrungsmittel und ungekoppelte Haptene werden ebenso wie Selbst-Strukturen toleriert oder ignoriert. Auf der anderen Seite sind womöglich nicht alle Selbst-Antigene in den zentralen lymphatischen Organen exprimiert, und eine Toleranz gegenüber vielen peripheren, gewebespezifischen Antigenen lässt sich daher nicht allein durch zentrale Deletion von selbstspezifischen Klonen erklären.

Polly Matzinger stellte die These auf, dass das entscheidende Kriterium für eine Aktivierung des Immunsystems nicht die Unterscheidung zwischen "Selbst" und "Fremd", sondern vielmehr zwischen "gefährlich" und "ungefährlich" ist (Matzinger, 1994). Inzwischen sind Mechanismen der angeborenen Immunität bekannt, die dem Immunsystem tatsächlich eine solche "Gefahr" signalisieren: Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen mikrobielle Strukturen wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid, virale doppelsträngige RNS oder bakterielle DNS und geben diese

"Informationen" durch Produktion von Zytokinen und Hochregulation von kostimulatorischen Signalen an das adaptive Immunsystem weiter (zur Übersicht: Medzhitov and Janeway, Jr., 1997). Dadurch ist die Bedeutung der angeborenen Immunität nicht nur als erste, unspezifische Abwehrlinie, sondern vielmehr als essentielle Regulation des adaptiven Immunsystems durch Erkennen und Vermitteln von "Gefahr"-Signalen zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997; Bendelac and Fearon, 1997; Janeway, Jr. and Medzhitov, 1998; Medzhitov and Janeway, Jr., 2000b).

Wenn man es aus dieser Perspektive betrachtet, ist die Abstoßung allogener Gewebe – theoretisch betrachtet – keine Selbstverständlichkeit, denn das transplantierte Gewebe hat keine Charakteristika eines pathogenen Erregers. Trotzdem wird das Immunsystem – offensichtlich sehr effektiv – durch die Transplantation von allogenen Gewebe aktiviert. Es ist denkbar, dass das natürliche Immunsystem auch in der Transplantatabstoßung eine wichtige Rolle für Aktivierung und Regulation adaptiver Immunität spielt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer solchen möglichen Rolle natürlicher Immunität bei der Abstoßung allogener Herztransplantate im Modellsystem der Maus.

1.1 ANGEBORENE IMMUNITÄT

Traditionell wird das Immunsystem in eine angeborene, oder natürliche, und eine adaptive, erworbene Komponente unterteilt. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Komponenten liegt in den Mechanismen und Rezeptoren zur Immunerkennung (zur Übersicht siehe Medzhitov and Janeway, Jr., 2000b).

Im adaptiven Immunsystem werden T- und B-Zell-Rezeptoren während der Entwicklung der Zellen durch somatische Mutation generiert, so dass jeder Lymphozyt einen strukturell einzigartigen Rezeptor erhält (Heinrich et al., 1984; Hayday et al., 1985). Während der Immunantwort werden dann Lymphozyten mit "nützlichen" Rezeptoren klonal expandiert, wenn sie auf das Antigen treffen, für das sie spezifisch sind (Burnet, 1959). Durch somatische Mutation entsteht eine enorme Vielfalt von Rezeptoren, und dies befähigt das Immunsystem, für praktisch jedes denkbare Antigen einen kognaten Rezeptor zu exprimieren sowie zwischen der großen Anzahl unterschiedlicher Antigene zu unterscheiden. Da die Rezeptoren jedoch durch Zufallsmechanismen generiert werden, können sie vor ihrer Selektion keine Information über ihren potentiellen Liganden besitzen. Informationsübermittlung über Rezeptor-Liganden-Systeme entsteht durch Evolution: Organismen, die nach der Bindung eines Liganden an einen Rezeptor eine "sinnvolle" Reaktion einleiten, besitzen einen Selektionsvorteil gegenüber Organismen, die dies nicht tun. Erst dadurch erhält die Stimulation eines Rezeptors im Laufe der Evolution eine bestimmte Semantik. Rezeptoren, die nicht Keimbahn-kodiert sind, sondern durch Zufallsmechanismen entstehen, können nicht auf diese Weise eine Bedeutung erlangt haben. (Medzhitov and Janeway, Jr., 1996). Das zufällig entstandene Rezeptor-Repertoire des adaptiven

Immunsystems enthält Rezeptoren, die mit infektiösen Mikroorganismen reagieren ebenso wie für harmlose Umweltantigene und Selbstantigene spezifische Rezeptoren, und eine Unterscheidung zwischen diesen ist allein über klonotypische Rezeptoren nicht möglich. Ebenso wenig kann allein über diese durch somatische Rekombination entstanden Rezeptoren eine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Klassen von mikrobiellen Erregern erfolgen.

Im Gegensatz zur adaptiven Immunität wird natürliche Immunität durch Keimbahn-kodierte Mechanismen und Rezeptoren vermittelt. Dadurch erreicht das natürliche Immunsystem weder die Rezeptorvielfalt noch die feinen Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen einzelnen Antigenen des adaptiven Immunsystems, es hat aber den Vorteil, dass durch natürliche Selektion in der Evolution Rezeptoren mit bestimmten Spezifitäten entstanden sind, die Informationen über ihren jeweiligen Liganden übermitteln können – wie die Unterscheidung zwischen "Selbst" und "Fremd" oder "gefährlich" und "harmlos".

Das natürliche Immunsystem besitzt zwei grundsätzliche Unterscheidungsmechanismen: Die Erkennung der *Anwesenheit* von potentiell gefährlichen Mikroorganismen über Rezeptoren für konservierte molekulare Muster, die spezifisch für Mikroorganismen sind (Pattern-Recognition-Rezeptoren), sowie die Erkennung der *Abwesenheit* von "Selbst"-Strukturen (zur Übersicht siehe Medzhitov and Janeway, Jr., 1996).

1.1.1 Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Die Anwesenheit von Mikroorganismen wird durch nicht-klonale Rezeptoren erkannt, die spezifisch sind für konservierte molekulare Muster ("**pathogen associated molecular patterns**", PAMPs) (zur Übersicht siehe Janeway, Jr., 1989). PAMPs repräsentieren molekulare Strukturen, die von Mikroorganismen, nicht aber von Säugetieren produziert werden, wie z.B. Peptidoglykan und Lipopolysaccharid (LPS). Die Erkennung solcher Strukturen ermöglicht dem natürlichen Immunsystem daher auf sehr einfache Weise, unzweifelhaft zwischen "Selbst" und "Fremd" zu unterscheiden. Darüber hinaus wird angenommen, dass PAMPs konservierte molekulare Muster sind, die für das Überleben der Mikroorganismen essentiell sind. Dies erschwert die Entwicklung von "escape"-Mutanten. Häufig sind PAMPs Strukturen, die großen Gruppen von Mikroorganismen gemeinsam sind, wie z.B. bakterielle DNS mit unmethylierten CpG-Motiven (Wagner, 2001). Diese Eigenschaft der PAMPs macht es möglich, dass eine begrenzte Anzahl von Keimbahn-kodierten Rezeptoren dennoch eine große Vielfalt von Mikroorganismen erkennen kann. PAMPs kennzeichnen häufig eine bestimmte Klasse von Pathogenen: Gramnegative Bakterien besitzen LPS, grampositive Lipoteichonsäure; entsprechend sind Lipoarabinomannan kennzeichnend für Mykobakterien und Mannane für Fungi. Die Erkennung solcher PAMPs liefert dem Immunsystem daher zusätzlich zu dem Signal der Anwesenheit eines pathogenen Erregers weitere Informationen über die Art des vorliegenden Erregers. Durch Erkennung einer bestimmten Klasse von Pathogenen erhält das Immunsystem die Möglichkeit, für unterschiedliche

Klassen von Pathogenen jeweils protektive Immunantworten einzuleiten (Medzhitov and Janeway, Jr., 2000a).

1.1.2 Pattern-Recognition-Rezeptoren

Die beschriebenen Eigenschaften machen PAMPs zu besonders geeigneten Zielstrukturen des natürlichen Immunsystems. Eine Reihe von Keimbahn-kodierten Rezeptoren erkennen PAMPs und werden daher als **Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR)** bezeichnet. Die Bindung kann dabei entweder direkt oder auch über PAMP-spezifische Adapter-Proteine erfolgen. Sowohl strukturell als auch funktionell bilden diese Pattern-Recognition-Rezeptoren eine heterogene Gruppe von Proteinen (zur Übersicht siehe Medzhitov and Janeway, Jr., 1997). Als an der Erkennung von PAMPs durch Pattern-Recognition-Rezeptoren beteiligte strukturelle Domänen sind u.a. die C-Typ-Lektin-Domäne, die Scavenger Rezeptor Cystein-reiche Domäne sowie die **Leucin-reiche-Repeat (LRR)**-Domäne bekannt. PRRs können in Körperflüssigkeiten sezerniert werden oder als zytoplasmatische oder Zelloberflächenmoleküle vorliegen (zur Übersicht siehe Medzhitov and Janeway, Jr., 2000a).

Funktionell sind PRRs beteiligt an der Opsonisierung von Partikeln für die Phagozytose oder Aktivierung des Lektin-Weges der Komplement-Aktivierung (zur Übersicht siehe Fraser et al., 1998). Endozytotische PRRs wie der Makrophagen Mannose-Rezeptor oder der Makrophagen Scavenger-Rezeptor befinden sich auf der Oberfläche von Phagozyten und vermitteln die Aufnahme von gebundenen Pathogenen (zur Übersicht siehe Stahl and Ezekowitz, 1998). Von besonderem Interesse sind signalisierende Rezeptoren: Diese aktivieren nach Bindung ihres Liganden Signal-Transduktions-Wege, über welche die Transkription von verschiedenen Genen induziert wird. Dies kann sowohl zur Produktion von direkt antimikrobiell wirksamen Substanzen als auch zur Expression von Zytokinen und Kostimulationsmolekülen führen. Zellen des natürlichen Immunsystems können so die Information "Anwesenheit eines Pathogens einer bestimmten Klasse" in die für das adaptive Immunsystem verständliche "Sprache" (Zytokine und Kostimulationssignale) übersetzen (Medzhitov and Janeway, Jr., 1996; Medzhitov et al., 1997a).

1.1.3 Kommunikation zwischen natürlichem und adaptiven Immunsystem am Beispiel von Toll-like-Rezeptoren

Eine Familie von signaltransduzierenden Rezeptoren, die phylogenetisch hoch konserviert und über deren Liganden und Funktion in den letzten Jahren viel bekannt geworden ist, bilden die Toll-like-Rezeptoren (TLR) (Medzhitov et al., 1997a; Rock et al., 1998). Diese Rezeptorfamilie eignet sich zur Illustration der Kommunikation des nativen mit dem adaptiven Immunsystem, da über den weitgehend bekannten Signaltransduktionsweg die "Übersetzung" der Information von der Bindung des spezifischen Liganden bis zur Induktion von kostimulatorischen Signalen und Zytokinen verfolgt werden kann.

Der erste Rezeptor der Familie (*toll*) wurde in *Drosophila* als Komponente eines Signalweges identifiziert, der die dorsoventrale Polarität in der Embryonalentwicklung kontrolliert (Hashimoto et al., 1988). Zusätzlich spielen Rezeptoren dieser Familie aber auch in *Drosophila* eine wichtige Rolle in der Immunantwort: *Drosophila* mit einer loss-of-function Mutation im *toll* Protein zeigen eine deutlich erhöhte Suszeptibilität gegenüber Pilzinfektionen und sind nicht in der Lage, die Expression des antimykotisch wirksamen Defensins Drosomycin zu induzieren (Lemaitre et al., 1996). *Drosophila* mit einer Mutation in 18-Wheeler, einem anderen TLR, sind nicht in der Lage, Infektionen mit gramnegativen Erregern zu erkennen und darauf das gegen gram-negative Bakterien wirksame Peptid Attacin zu produzieren (Williams et al., 1997). Bereits in *Drosophila* also, einem Organismus, der allein über natürliche Immunität verfügt, kann über PRR nicht nur die Anwesenheit, sondern auch die Art der Infektion (in diesem Fall gramnegatives Bakterium vs. Pilz) detektiert werden (Lemaitre et al., 1996; Lemaitre et al., 1997; Williams et al., 1997).

Sowohl humane, murine als auch *Drosophila* TLRs enthalten eine extrazelluläre LRR-Domäne und eine zytoplasmatische signaltransduzierende Domäne, die homolog zur zytoplasmatischen Domäne des IL-1 Rezeptors ist und daher als TIR (Toll/ IL-1-Rezeptor-Domäne) bezeichnet wird (zur Übersicht siehe Kopp and Medzhitov, 1999). Diese TIR-Domäne interagiert mit einer strukturell ähnlichen Domäne eines Adapterproteins, MyD88 (Medzhitov et al., 1998). MyD88 besitzt eine C-terminale TIR-Domäne und eine N-terminale Todes-Domäne ("death domain") (Hardiman et al., 1996), über die es an die Todes-Domäne der IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK) bindet. MyD88 bringt so IRAK zum Rezeptorkomplex; dies führt über einen bisher nicht bekannten Mechanismus zur Autophosphorylierung und Aktivierung von IRAK (Muzio et al., 1997; Medzhitov et al., 1998). IRAK dissoziiert dann von MyD88 ab und assoziiert mit einem weiteren Adapterprotein, TRAF6 (TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6) (Wesche et al., 1997). Zwei weitere Kinasen-Aktivierungs-Schritte führen schließlich zur Phosphorylierung von I κ B und damit zu dessen Abbau; NF κ B wird freigesetzt, transloziert in den Kern und aktiviert eine Reihe von Genen mit NF κ B-Bindungsstellen in ihren Promotoren, wie die für IL-1 β , IL-6, IL-8 und CD80 und CD86 kodierenden Gene (Medzhitov et al., 1997a). Neben NF κ B wird durch TRAF-6 auch der Transkriptionsfaktor AP-1 über die Stress-Kinasen-Kaskade aktiviert, welches ebenfalls zur Transkription einer Reihe von Zytokinen führt (Abbas et al., 2000b; Takeuchi and Akira, 2001).

Bei einer Infektion mit gram-negativen Bakterien bindet ein Komplex aus bakteriellem LPS, LPS bindendem Protein (LBP) und dem LPS-Rezeptor CD14 an den Toll-like-Rezeptor 4 und führt letztlich zu Zytokinproduktion und Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 – Signale für das adaptive Immunsystem, dass der Erreger vorhanden ist (Medzhitov et al., 1997a; zur Übersicht: Hoffmann et al., 1999).

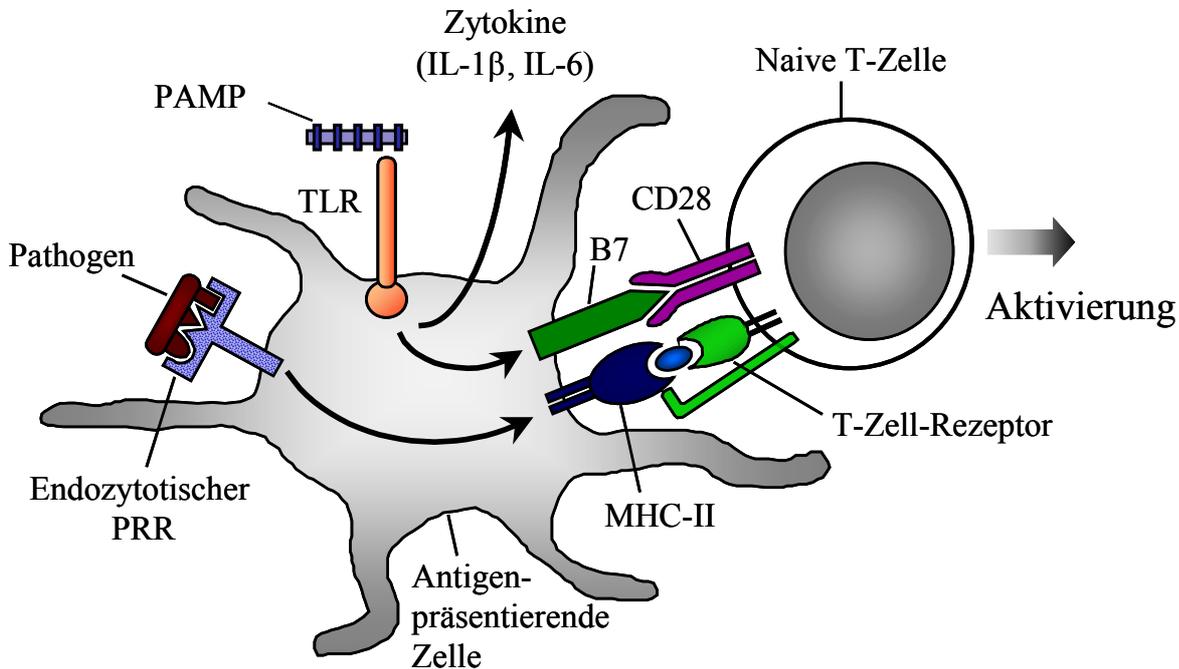


Abbildung 1.1: Zusammenspiel von natürlicher und adaptiver Immunität.

Die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern durch PRRs wie Toll-like-Rezeptoren generiert Signale, die das adaptive Immunsystem aktivieren. Endozytotische PRRs vermitteln die Aufnahme eines Pathogens durch Antigen-präsentierende Zellen. Nach Prozessierung der Proteine werden vom Pathogen abgeleitete Peptide als Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Diese Komplexe werden durch T-Zell-Rezeptoren (TZR) erkannt. Im Fall von signalisierenden PRRs führt die Erkennung von PAMPs zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen, welche die Expression von Zytokinen, Chemokinen und kostimulatorischen Molekülen induzieren. PRRs spielen so eine Rolle sowohl in der Präsentation von Peptid-MHC-Komplex als auch in der für die Aktivierung von T-Zellen notwendigen Kostimulation (nach: Medzhitov and Janeway, Jr., 2000b).

1.1.4 Erkennung der Abwesenheit von Selbst

Neben der (Positiv-) Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern verwendet das natürliche Immunsystem eine zweite, völlig unterschiedliche Strategie: Die Erkennung der *Abwesenheit* von Selbst-Markern auf der Zelloberfläche. Beispiele für diesen Mechanismus sind die Erkennung von autologen MHC-Klasse-I (MHC-I) Molekülen durch inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen (s.u.) sowie die Funktion von DAF (decay-accelerating factor) und MCP (membrane cofactor proteins) im alternativen Komplementweg. DAF und MCP sind speziesabhängig auf den meisten Zellen exprimiert und verhindern die Aktivierung der C3-Komponente auf autologem Gewebe (zur Übersicht siehe Atkinson and Farries, 1987).

1.1.4.1 Natürliche Killerzellen und "Missing Self"

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind eine $CD3^- sIg^- TZR^- Fc\gamma RIII^+$ Subpopulation von Lymphozyten, die in der Lage sind, eine Reihe von Zielzellen, u.a. Tumor- und virusinfizierte Zellen, zu lysieren und nach Aktivierung Zytokine (wie z.B. $IFN\gamma$ und TNF) zu sezernieren. NK-Zellen haben ihre TZR- und Immunglobulin-Gene in Keimbahnkonfiguration und sind sowohl in Nackt- als auch in SCID- und Rag-defizienten Mäusen vorhanden und funktionell (Dorshkind et al., 1985; zur Übersicht: Trinchieri, 1989; Trinchieri, 1995). NK-Zellen lysieren bestimmte Tumorzellen, obwohl diese keine oder nur minimale Mengen von MHC-Molekülen exprimieren (Trinchieri and Santoli, 1978; Stern et al., 1980) – zytotoxische T-Zellen dagegen, denen natürliche Killerzellen in einigen Aspekten ähneln, lysieren nur Zellen, die Fremdantigene im Zusammenhang mit Selbst-MHC präsentieren (Zinkernagel and Doherty, 1974; Zinkernagel and Doherty, 1997). Die Spezifität natürlicher Killerzellen muss also durch einen grundsätzlich anderen als den von T-Zellen bekannten Mechanismus bestimmt werden.

Ljunggren und Kärre schlugen vor, dass NK-Zellen solche Zielzellen gerade *wegen* ihrer reduzierten Expression von Selbst-MHC-Klasse-I-Molekülen lysieren. Nach dieser "Missing Self"-Hypothese ist es eine Funktion von NK-Zellen, Zellen mit einer reduzierten Expression von Selbst-MHC-I-Molekülen zu erkennen und zu eliminieren (Karre et al., 1984; Karre et al., 1986). Die Hypothese hat ihren Ursprung in Beobachtungen der NK-Zell-vermittelten Abstoßung von allogenen Lymphomzellen und Knochenmarktransplantaten und von "Hybrid-Resistenz": NK-vermittelter Abstoßung von homozygoten, parental (z.B. $H-2^{b/b}$) Lymphom- bzw. Knochenmarkzellen durch einen heterozygoten (z.B. $H-2^{b/d}$), letal bestrahlten Empfänger (Cudkowicz und Bennett, 1971; Karre et al., 1986; Bennett, 1987). Beiden Situationen ist gemeinsam, dass dem transplantierten Gewebe mindestens ein MHC-I-Allel des Empfängers fehlt. Ljunggren und Kärre beobachteten, dass durch Mutagenese generierte MHC-I-defiziente Lymphomzelllinien in Übereinstimmung mit der Hypothese von C57BL/6 Mäusen abgestoßen wurden, während die entsprechenden MHC-I-positiven Zelllinien zu Tumorwachstum führten. Sie konnten zeigen, dass dieser Effekt durch NK-Zellen vermittelt war, da er nicht nur einige Charakteristika einer NK-mediierten Immunantwort aufwies (Thymus-Unabhängigkeit, schneller Beginn, keine Notwendigkeit der vorherigen Immunisierung), sondern die Abstoßung sich auch durch vorherige Depletion der Empfänger von Asialo-GM1- oder NK1.1-positiven (NK-) Zellen verhindern ließ (Ljunggren und Karre, 1985; Ljunggren und Karre, 1990).

Eine weitere wichtige Beobachtung zur Spezifität von NK-Zellen wurde von Becker *et al* beschrieben. YAC-1-Zellen, die *in vivo* gewachsen sind oder *in vitro* mit $IFN\gamma$ in Kultur gehalten wurden, sind vor NK-Zellen autologer Mäuse geschützt. Dieser Schutz kann durchbrochen werden, indem die Zellen *in vitro* in Abwesenheit von $IFN\gamma$ kultiviert werden, wodurch die MHC-Klasse-I-Expression von YAC-1-Zellen deutlich reduziert wird (Becker et al., 1978).

Als gemeinsamen Nenner der beobachteten Phänomene postulierte Klaas Kärre, dass NK-Zellen solche Zellen nicht lysieren, die „**hohe Level eines vollständigen Satzes von autologen MHC-I-Molekülen**“ exprimieren (Karre, 1997, S. 7).

Unterdrückung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen ist eine von vielen Viren angewandte Strategie, sich vor zytotoxischen T-Zellen zu schützen (del Val et al., 1992; Jones et al., 1995; zur Übersicht: Ploegh, 1998; Tortorella et al., 2000). Auch maligne Tumore haben häufig eine verringerte MHC-Klasse-I-Expression, möglicherweise aufgrund des Selektionsdrucks durch zytotoxische T-Zellen (Algarra et al., 2000). Durch ihre Fähigkeit, fehlende bzw. erniedrigte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen zu erkennen, stellen NK-Zellen ein funktionell zu T-Zellen komplementäres System dar, das pathologisch veränderte Zellen gerade dann erkennen kann, wenn sie für T-Zellen "unsichtbar" sind.

Zur Erklärung der beobachteten Spezifität von NK-Zellen wurden zunächst zwei konkurrierende Modelle diskutiert: Das Ziel-Interferenz-Modell (Vorhandensein von MHC-I Molekül auf der Zielzelle interferiert mit der Erkennung eines anderen Moleküls durch einen aktivierenden Rezeptor der NK-Zellen) und das Effektor-Inhibitions-Modell (ein inhibitorischer Rezeptor auf der Effektorzelle liefert bei Bindung von Selbst-MHC-I ein negatives Signal, siehe Abbildung 1.2) (Ljunggren und Karre, 1990).

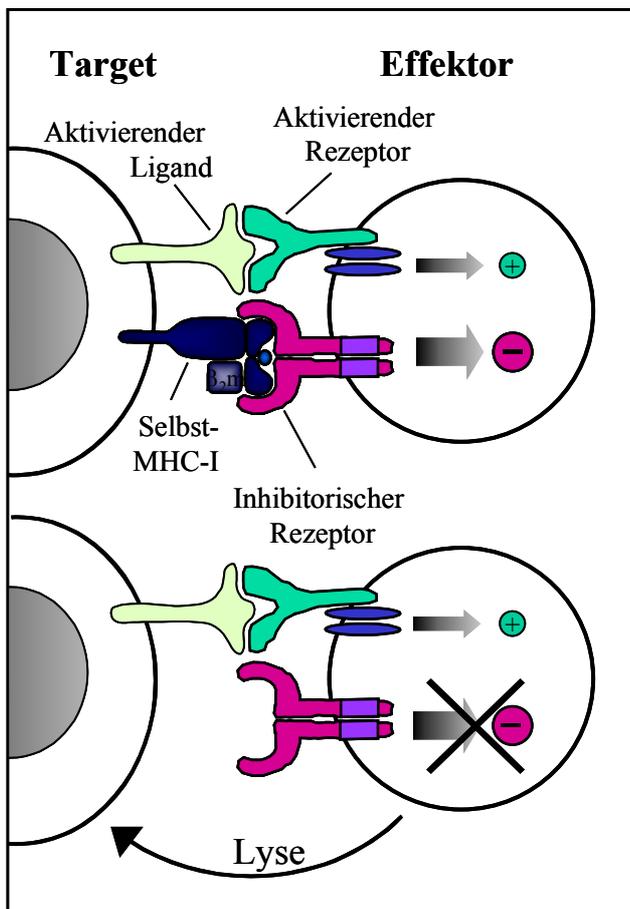


Abbildung 1.2: "Missing Self"-Hypothese (Effektor-Inhibitions-Modell).

Bei vorhandenem Selbst-MHC-I auf der Ziel-Zelle wird die Aktivierung der Effektorzelle durch ein inhibitorisches Signal verhindert. In Abwesenheit von Selbst-MHC-I auf der Zielzelle fehlt dieses inhibitorische Signal, die Effektorzelle wird aktiviert, und es kommt zur Lyse der Zielzelle.

1.1.4.2 Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren

Die durch das Effektor-Inhibitions-Modell vorausgesagten MHC-I-spezifischen inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren sind inzwischen sowohl im murinen (Karlhofer et al., 1992) als auch im humanen (Moretta et al., 1993; zur Übersicht: Moretta et al., 1994; Lanier und Phillips, 1995) System gezeigt worden. Grundsätzlich sind zwei strukturell unterschiedliche Typen von MHC-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen beschrieben: Typ-I integrale monomere Membranproteine, die der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie) angehören und Typ-II integrale C-Typ-Lektine. Der Immunglobulin-Superfamilie angehörige inhibitorische Rezeptoren sind auf humanen NK-Zellen exprimiert und werden als "killing inhibitory receptors" (KIRs) bezeichnet. Sie besitzen zwei (p58) oder drei (p70) immunglobulinartige Domänen in ihrem extrazellulären Bereich. (zur Übersicht: Lanier, 1997; Colonna, 1997). Zu den inhibitorischen Rezeptoren mit C-Typ-Lektin-Homologie gehören murine homodimere Rezeptoren der Ly-49-Familie (Wong et al., 1991; Yokoyama et al., 1995; Raulet und Held, 1995) sowie CD94, welches Heterodimere mit Molekülen der NKG2-Familie bildet (Lazetic et al., 1996; Vance et al., 1997). CD94-NKG2-Heterodimere sind die einzigen bisher bekannten MHC-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren, die sowohl in Nagetieren als auch im Menschen exprimiert sind. Sie erkennen (mit Ausnahme von NKG2D) die nicht-klassischen MHC-I-Liganden Qa-1^b in der Maus bzw. HLA-E im Menschen, wobei die Erkennung von der Anwesenheit eines bestimmten Peptids, das von der Signalsequenz einiger klassischer MHC-I-Moleküle stammt, abhängig zu sein scheint (DeCloux et al., 1997; Vance et al., 1998; Braud et al., 1998; Borrego et al., 1998). Diese Beobachtungen deuten auf einen eleganten Mechanismus hin, durch den NK-Zellen MHC-I-Expression und Antigen-Prozessierung indirekt überwachen können.

KIRs sowie Moleküle der Ly-49 und NKG-2-Familien besitzen in ihrem zytoplasmatischen Bereich Immunrezeptor Tyrosin-basierte inhibitorische Motive (ITIMs), charakterisiert durch die Konsensus-Sequenz I/VxYxxL (Burshtyn et al., 1997; Vely et al., 1997). Rezeptor-Kreuzvernetzung führt zu Phosphorylierung des Tyrosins im ITIM-Motiv und daraus folgender Rekrutierung der intrazellulären Tyrosin-Phosphatase SHP-1, die über ihre SH-2-Domäne an das ITIM-Motiv bindet (Binstadt et al., 1996; Burshtyn et al., 1996; zur Übersicht: Long, 1999). Interessanterweise gibt es in allen drei Molekülfamilien auch Mitglieder mit einem kurzen zytoplasmatischen Bereich, die kein ITIM-Motiv besitzen. Hierzu gehören die p50-Rezeptoren der humanen KIR-Familie, der murine Rezeptor Ly-49D, sowie NKG2C, D und E, die sowohl im humanen als auch im murinen System existieren (Biassoni et al., 1996; Mason et al., 1996; Houchins et al., 1997; Bauer et al., 1999; Vance et al., 1999). Diese haben keine inhibitorischen, sondern aktivierende Funktionen. Sie weisen in ihrem Transmembranbereich eine basische Aminosäure auf, die für die Assoziation mit aktivierenden signaltransduzierenden Untereinheiten bedeutsam zu sein scheint (s.u.) (Lanier et al., 1998b; zur Übersicht: Lopez-Botet et al., 2000).

Murine Ly-49-Rezeptoren bilden eine kleine Familie von insgesamt neun derzeit bekannten, eng verwandten Genen, die als Ly-49 A bis I bezeichnet werden. Das erste Gen der Familie wurde 1989 als potentieller T-Zell-Rezeptor beschrieben (Chan und Takei, 1989). Karlhofer und Yokoyama konnten zeigen, dass dieses in der Folge als Ly-49A bezeichnete Molekül ein MHC-I-spezifischer inhibitorischer Rezeptor auf NK-Zellen ist (Karlhofer et al., 1992). Die Gene dieser Rezeptorfamilie befinden sich auf Chromosom sechs in einem Bereich, der als "NK-Gen-Komplex" bezeichnet wird (Yokoyama und Seaman, 1993).

Der Ly49-Familie angehörige Moleküle sind auf überlappenden Subpopulationen (zwischen 15% und 60%) muriner NK-Zellen exprimiert (Bennett et al., 1995; Yu et al., 1996; Hoglund et al., 1997). Ly-49-Rezeptoren erkennen nicht nur die Expression von MHC-I-Molekülen, sondern differenzieren zwischen verschiedenen Allotypen, indem sie jeweils bestimmte Gruppen von MHC-I-Molekülen binden. Im Unterschied zu TZR scheint in der Mehrzahl der Fälle die Bindung von Ly-49-Rezeptoren an ihre MHC-I-Liganden unabhängig vom gebundenen Peptid zu sein (Correa und Raulet, 1995). Die spezifischen Bindungspartner der unterschiedlichen Ly-49-Moleküle sind bisher nur zum Teil bekannt (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Liganden muriner Ly-49-Rezeptoren

Ly49-Rezeptor	Funktion	bekannte Liganden	Referenzen
Ly49A	inhibitorisch	H-2D ^d , D ^k , D ^p , D ^q , L ^q	Karlhofer et al., 1992; Kane, 1994; Yu et al., 1996; Matsumoto et al., 2001; Olsson-Alheim et al., 1999
Ly49C	inhibitorisch	H-2K ^b , D ^b , H-2 ^d	Brennan et al., 1994; Yu et al., 1996; Michaelsson et al., 2000
Ly49D	aktivierend	H-2D ^d , D ^r , D ^{sp2}	George et al., 1999
Ly49G2	inhibitorisch	H-2D ^d , L ^d	Mason et al., 1995

Die Anzahl der NK-Zellen, die einen bestimmten Ly-49-Rezeptor exprimieren (Held et al., 1996), insbesondere aber die Expressionslevel (Olsson et al., 1995), sind abhängig von der Anwesenheit von MHC-Klasse-I-Molekülen im Organismus. Man nimmt an, dass in der Entwicklung von natürlichen Killerzellen ein – bisher nicht geklärter- "Erziehungsprozess" stattfindet, der u.a. sicherstellt, dass jede NK-Zelle mindestens einen selbst-spezifischen Ly-49-Rezeptor exprimiert, und so Toleranz gegenüber körpereigenen Geweben gewährleistet. Da NK-Zellen auch Ly-49-Rezeptoren besitzen, die für in dem jeweiligen Mausstamm nicht exprimierte MHC-I-Moleküle spezifisch sind, kann es sich dabei nicht um eine einfache Positiv-Selektion handeln, bei der Rezeptor-Erkennung durch Selbst-MHC-I die einzige Voraussetzung für das Überleben der NK-

Zelle ist (Hoglund et al., 1997). Interessanterweise führt das Vorhandensein eines MHC-I-Liganden sogar eher zu einer niedrigeren Expression des kognaten Ly-49-Rezeptors auf NK-Zellen (Sentman et al., 1995; Salcedo et al., 1997). Man nimmt an, dass dies zu einer erhöhten Sensitivität der NK-Zellen für erniedrigte Expression von Selbst-MHC-I-Molekülen führt.

1.1.5 Regulation natürlicher Killerzellen durch Integration aktivierender und inhibitorischer Signale

Durch welchen Mechanismus inhibitorische Signale via ITIM-Motive/Phosphatasen (SHP-1) die Aktivierung von NK-Zellen verhindern, ist bisher nicht genau bekannt. Es wird angenommen, dass SHP-1 proximal in aktivierende Signaltransduktionswege eingreift, indem es Proteine, die für ihre Aktivierung phosphoryliert werden, dephosphoryliert und damit inaktiviert (zur Übersicht siehe Leibson, 1997). Aber welche Rezeptoren und Signale aktivieren natürliche Killerzellen? Im Gegensatz zu B- und T-Zellen scheinen NK-Zellen nicht einen einzelnen Antigenrezeptor (analog zu membrangebundenem Immunglobulin bzw. TZR) zu besitzen, der für ihre Aktivierung verantwortlich ist. Vielmehr sind in den letzten Jahren eine Reihe von – teils auf Subpopulationen, teils weitreichend exprimierten – aktivierenden Rezeptoren beschrieben worden, von denen man annimmt, dass sie eine Rolle in der Aktivierung von NK-Zellen spielen.

B-Zell- und T-Zell-Rezeptor sind Komplexe mehrerer Protein-Untereinheiten, in denen sich Liganden-bindende und signaltransduzierende Module innerhalb verschiedener Protein-Ketten befinden. Kleine transmembrane Adapterproteine mit Immunrezeptor-Tyrosin-basierten aktivierenden Motiven (ITAMs) in ihrer zytoplasmatischen Domäne sind für die Signaltransduktion verantwortlich (Reth, 1989). Diese Adapterproteine besitzen eine saure Aminosäure im Transmembranbereich, die Voraussetzung für die Assoziation mit der Liganden-bindenden Untereinheit ist, die typischerweise eine basische Aminosäure (Arginin oder Lysin) im Transmembranbereich aufweist. Ligandenbindung an den Rezeptorkomplex führt zu Phosphorylierung der Tyrosine im ITAM, was in der Rekrutierung und Aktivierung von Syk oder ZAP-70 zytoplasmatischen Tyrosinkinase resultiert (zur Übersicht: Isakov, 1998; Lanier, 2001).

NK-Zellen exprimieren drei der bekannten ITAM-haltigen Transmembran-Adapter-Proteine: ζ , Fc ϵ RI γ und DAP-12 (Lanier et al., 1991; Wu et al., 2000). Der am besten charakterisierte aktivierende Rezeptor auf NK-Zellen ist Fc γ RIII, der niedrigaffine Fc-Rezeptor für IgG. Dieser ist für Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) verantwortlich (Lanier et al., 1989; zur Übersicht: Trinchieri, 1989; Brumbaugh et al., 1998). Seine Liganden-bindende α -Untereinheit (CD16) assoziiert mit Fc ϵ RI γ -Homodimeren (Maus und Mensch) oder Fc ϵ RI γ / ζ -Heterodimeren (Mensch). Aktivierung von NK-Zellen über Fc γ RIII führt zu Degranulierung und Zytokinproduktion (Anegon et al., 1988).

NK-Zell-Rezeptoren, die eine Rolle in natürlicher Zytotoxizität spielen, assoziieren ebenfalls mit ITAM-haltigen Adapterproteinen. Beispielsweise assoziieren murines NKR-P1C (entspricht dem phänotypischen NK-Zell-Marker NK1.1) mit Fc ϵ RI γ (Arase et al., 1997) und die kürzlich beschriebenen Rezeptoren NKp30 und NKp46 mit Fc ϵ RI γ / ζ Heterodimeren (Pessino et al., 1998; Pende et al., 1999). Die physiologischen Liganden dieser Rezeptoren sind bisher nicht bekannt. Eine Reihe der oben erwähnten aktivierenden Formen MHC-I-spezifischer NK-Zell-Rezeptoren (KIR2DS2, CD95-NKG2C, Ly-49D und Ly-49H) assoziiert mit dem ITAM-haltigen Adapterprotein DAP-12 (Smith et al., 1998; Lanier et al., 1998a; Lanier et al., 1998b).

NKG2D dagegen assoziiert mit DAP-10, welches anstatt eines ITAMs ein YxxM Motiv enthält und als Adapterprotein für die Bindung und Aktivierung der Phosphoinosit-3-Kinase (PI3K) zu fungieren scheint (Songyang et al., 1993; Wu et al., 1999). NKG2D bindet strukturell mit MHC-I verwandte Liganden: Humanes NKG2D erkennt die Glykoproteine MICA und MICB, deren Gene innerhalb des MHC-Lokus liegen (Bauer et al., 1999). Murine Homologe von MICA und MICB sind nicht bekannt. In der Maus sind Moleküle mit schwächerer Homologie zu MHC-I identifiziert worden (RAE-1 und H-60), die als Liganden für NKG2 fungieren (Nomura et al., 1996; Malarkannan et al., 1998). In den Familien der KIR, CD94-NKG2 und möglicherweise auch der Ly-49 Rezeptoren scheinen jeweils die inhibitorischen Formen eine höhere Affinität zu MHC-I zu haben als die aktivierenden Rezeptoren (Winter et al., 1998; Vales-Gomez et al., 1999). Da NK-Zellen gleichzeitig aktivierende und inhibitorische Rezeptoren mit Spezifität für Selbst-MHC-I exprimieren können, könnte die höhere Affinität der inhibitorischen Rezeptoren wichtig sein, um eine autoimmune Reaktion gegen körpereigene Zellen mit normaler MHC-I-Expression zu verhindern.

Ebenso wie DAP-10 enthält auch das von T-Zellen bekannte kostimulatorische Molekül CD28, auf das in Kapitel 1.2 genauer eingegangen wird, ein YxxM Motiv, welches PI3K bindet und aktiviert (Prasad et al., 1994; Truitt et al., 1994; Pages et al., 1994). CD28 ist auf der Mehrzahl muriner NK-Zellen exprimiert, und Interaktionen mit Zielzellen, welche die Liganden für CD28, CD80 und CD86, exprimieren, können NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität, Proliferation und Zytokinproduktion verstärken (Nandi et al., 1994; Geldhof et al., 1995; Chambers et al., 1996).

Ein weiterer aktivierender NK-Zell-Rezeptor ist 2B4 (CD244), ein Molekül der Ig-Superfamilie, das (in bestimmten Mausstämmen) auf praktisch allen NK-Zellen exprimiert ist und Zytokinproduktion sowie Zytotoxizität aktivieren kann (Garni-Wagner, 1993; Mathew et al., 1993). Der Ligand für 2B4 ist CD48 (Brown et al., 1998; Latchman et al., 1998), ein nahezu ubiquitär exprimiertes Zelloberflächen-Glykoprotein, dessen Expression in pathologischen Situationen, z.B. bei EBV-Infektion, signifikant hochreguliert ist (Yokoyama et al., 1991; Klamann und Thorley-Lawson, 1995).

Liganden für aktivierende Rezeptoren können physiologisch auf normalen Zellen exprimierte Moleküle sein. Führen pathologische Veränderungen zum Fehlen oder zur Reduktion von Selbst-Liganden für inhibitorische Rezeptoren, so kann es zum Überwiegen der positiven Signale und

zur Aktivierung von NK-Zellen kommen. Andere Liganden für aktivierende Rezeptoren sind Moleküle, die speziell auf pathologisch veränderten Zellen exprimiert bzw. hochreguliert werden; z.B. werden die Liganden für NKG2D auf Tumorzellen exprimiert und CD48 durch EBV-Infektion hochreguliert (Groh et al., 1999).

Die z. Zt. vorliegenden Daten unterstützen daher die Anschauung, dass der Aktivitätszustand einer NK-Zelle letztlich durch das Gleichgewicht aller positiven und negativen Signale bestimmt wird (Abbildung 1.3) (Brumbaugh et al., 1998). Theoretisch postulierten Ljunggren und Kärre bereits 1990 ein solches Szenario, welches sie als "Multiple Choice"-Modell bezeichneten (Ljunggren und Karre, 1990; Karre, 1991).

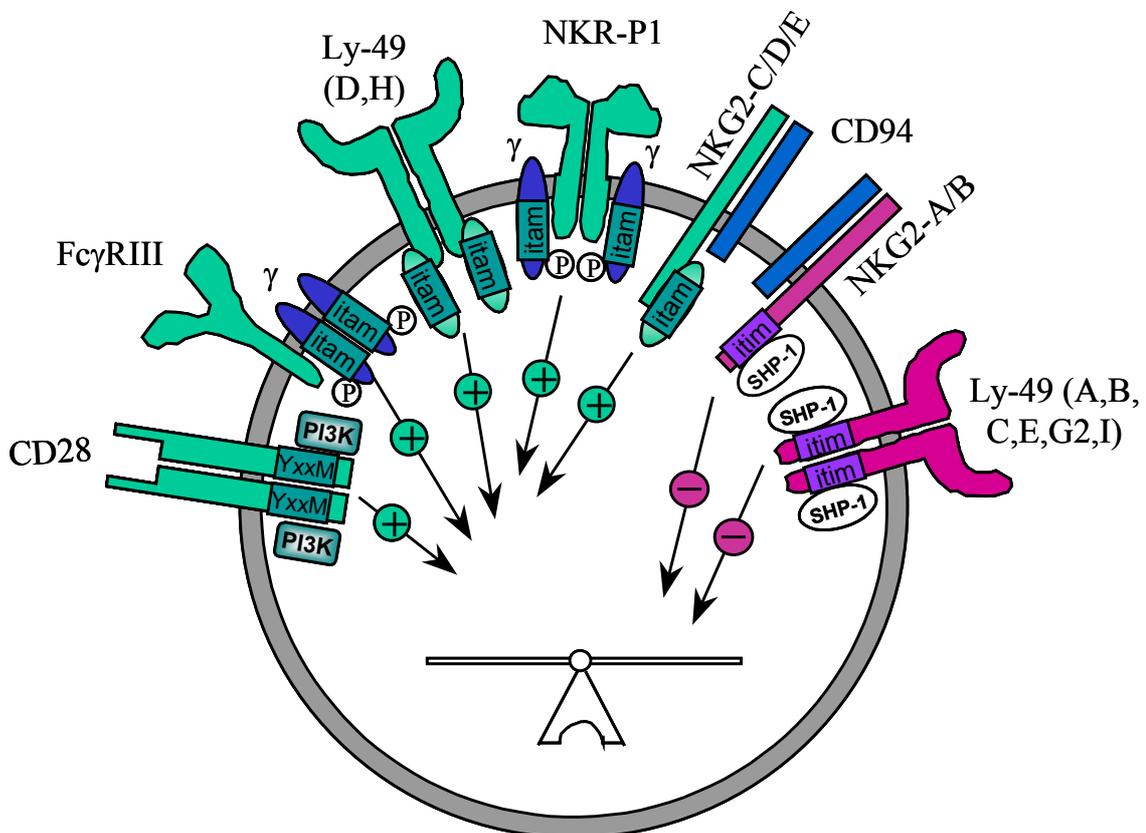


Abbildung 1.3: Regulierung des Aktivitätszustands natürlicher Killerzellen durch aktivierende und inhibitorische Rezeptoren.

Natürliche Killerzellen exprimieren eine Vielzahl von aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren. Ihr Aktivitätszustand scheint durch das Gleichgewicht der Rezeptor-vermittelten Signale kontrolliert zu werden. Aktivierende Rezeptoren assoziieren mit ITAM-haltigen Adapterproteinen, die zytosolische Tyrosinkinasen rekrutieren und aktivieren, oder besitzen YxxM-Motive zur Assoziation mit und Aktivierung von PI3K. Inhibitorische Rezeptoren rekrutieren über ITIM-Motive zytosolische Tyrosin-Phosphatasen.

1.2 ADAPTIVE IMMUNITÄT UND KOSTIMULATION

Adaptive Immunantworten sind abhängig von der Aktivierung antigenspezifischer Lymphozyten. Dieser Prozess wird durch die Bindung des kognaten Antigens – bzw. MHC-Peptid-Komplexes im Falle der T-Zellen – an die durch somatische Rekombination entstandenen klonotypischen Rezeptoren von B- und T-Zellen ausgelöst. Dieses durch die Interaktion des Antigenrezeptors mit seinem spezifischen Liganden entstandene Signal wird konventionell als "Signal 1" bezeichnet (Janeway, Jr., 1989).

Bretscher und Cohn postulierten 1970 als erste, dass B-Zellen zu ihrer Aktivierung *zwei* Signale benötigen; als zweites Signal schlugen sie einen bereits im Organismus vorhandenen "Carrier"-Antikörper vor, der an eine zweite antigene Determinante eines Antigens bindet, dadurch eine Konformationsänderung erfährt und in dieser geänderten Konformation das zweite Signal für die Aktivierung liefert (Bretscher und Cohn, 1970). Die "Zwei-Signale"-Theorie erwies sich als grundlegendes Prinzip für die Aktivierung sowohl von B- als auch von T-Zellen, auch wenn sich herausstellte, dass der Mechanismus sich grundlegend von dem ursprünglich vorgeschlagenen unterscheidet.

Die Bindung eines spezifischen Liganden an den Antigenrezeptor (Signal 1) ist zwar notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für die effektive Aktivierung von naiven T- und B-Zellen. Naive B-Zellen benötigen in den meisten Fällen zu ihrer Aktivierung zusätzlich T-Zell-Hilfe in Form von Zytokinen und Signalen über membranständige Moleküle (CD40/CD40L-Interaktion) (Maliszewski et al., 1993; zur Übersicht: Armitage et al., 1993; Matzinger, 1994).

Lafferty und Cunningham wandten das Konzept der "Zwei-Signale"-Theorie auf die Aktivierung von naiven T-Zellen an (Lafferty und Cunningham, 1975). Das von ihnen entwickelte Modell besagt, dass eine "Stimulator-Zelle" mit besonderen Eigenschaften für die Präsentation von Antigen an die potentiell reaktive T-Zelle erforderlich ist. Erkennung des MHC-Antigen-Komplexes liefert das "Signal 1" zur T-Zell-Aktivierung. Gleichzeitig liefern Stimulator-Zellen "Signal 2", das als kostimulatorische Aktivität bezeichnet wurde (Abbildung 1.4). Nur die Bindung eines MHC-Peptid-Komplexes an den TZR mit gleichzeitiger Kostimulation führt zur effektiven Aktivierung der T-Zelle. Signal 1 allein in Abwesenheit von Kostimulation dagegen führt nicht zur Aktivierung der T-Zelle und kann entweder zu einem langanhaltenden Zustand verminderter Reaktionsfähigkeit, der als Anergie bezeichnet wird, oder zum Tod der Zelle führen. Kostimulatorische Aktivität in Abwesenheit eines Stimulus über den Antigenrezeptor dagegen ist ein neutrales Ereignis, das nicht zur Aktivierung führt, aber die Zelle auch nicht in ihrer weiteren Reaktionsfähigkeit beeinträchtigt (Lafferty et al., 1983). Dieses Modell unterscheidet sich von dem 2-Signale-Modell der B-Zell-Aktivierung grundlegend darin, dass in dem von Bretscher und Cohn vorgeschlagenen Modell auch Signal 2 ein antigenspezifisches Ereignis ist. Im Kostimulationsmodell der T-Zell-Aktivierung dagegen ist Signal 2 ein antigenunabhängiges Ereignis, das

nur von bestimmten Zellen zur Verfügung gestellt werden kann (Lafferty, 1994). Eine wichtige Ergänzung des Modells besteht darin, dass für eine effektive T-Zell-Aktivierung Signal 1 und kostimulatorisches Signal auf derselben Zelle exprimiert sein müssen (Van Ewijk et al., 1988; Lassila et al., 1988). Da kostimulatorische Aktivität durch Komponenten von Pathogenen induziert wird (s.o.), lässt sich durch dieses Modell erklären, wie T-Zellen durch Antigen präsentierende Zellen (APZ), die Pathogene aufgenommen und kostimulatorische Moleküle hochreguliert haben, aktiviert werden können, ohne dass dies gleichzeitig zur Aktivierung von T-Zellen mit Spezifitäten gegen Selbst-Antigene führt. Die "Zwei-Signale"-Theorie und das Kostimulationsprinzip werden gelegentlich synonym verwendet, im engeren Sinne bezeichnet der Begriff Kostimulation jedoch die Übermittlung eines von Antigen-Rezeptor unabhängigen Signals durch einen oder mehrere Rezeptoren bei Bindung von membranständigen Liganden auf der Antigen präsentierenden Zelle.

Neben dem antigenspezifischen TZR-CD3-Komplex existiert eine Vielzahl von Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen, von denen die meisten mit entsprechenden Liganden auf APZ interagieren. Eine Reihe dieser Rezeptoren spielt eine Rolle in der Aktivierung von T-Zellen und ist in der Lage, Zytokinproduktion zu verstärken. Das bisher am besten untersuchte kostimulatorische Molekül CD28 scheint eine besonders wichtige Stellung in der Aktivierung von naiven T-Zellen zu besitzen, da es neben seiner aktivierenden Wirkung auch die Induktion von Anergie verhindert. Hierzu sind andere Moleküle in der Regel nicht in der Lage (zur Übersicht siehe Schwartz, 1992).

1.2.1 Struktur und Expressionsmuster des Kostimulationsmoleküls CD28 und seiner Liganden

CD28 ist ein auf praktisch allen murinen T-Zellen konstitutiv ausgeprägtes Oberflächenmolekül (Gross et al., 1992). Die basal vorhandene Expression kann durch Stimulation von T-Zellen durch Phorbolster oder gegen CD3 gerichtete monoklonale Antikörper (mAK) um das vier- bis achtfache erhöht werden (Linsley und Ledbetter, 1993). CD28 setzt sich aus zwei durch eine Disulfidbrücke verbundenen 44 kDa Untereinheiten zusammen und ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Jede Kette besteht aus einer einzelnen extrazellulären Ig-V-artigen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer 41 Aminosäuren umfassenden intrazellulären Domäne. Der intrazelluläre Bereich ist zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert und enthält mehrere Motive, die für die Assoziation mit Signaltransduktionsmolekülen bedeutsam zu sein scheinen. Eine direkte enzymatische Aktivität der intrazellulären Domäne ist indes nicht bekannt (zur Übersicht: June et al., 1994; Slavik et al., 1999). Auf die über Adaptermoleküle verlaufende Signaltransduktion des CD28-Rezeptors soll in Kapitel 1.2.2. genauer eingegangen werden.

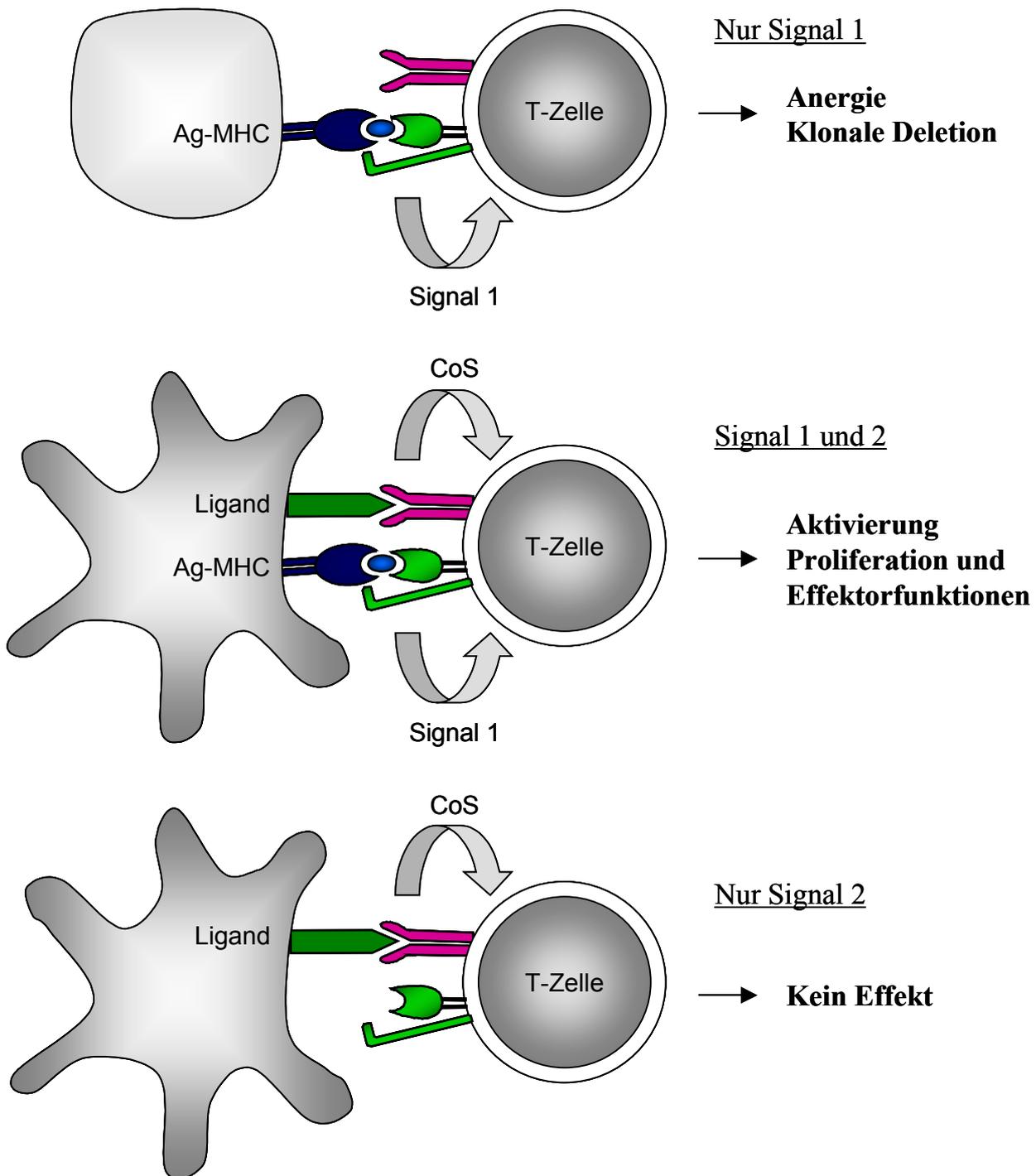


Abbildung 1.4: Das 2-Signale-Modell der T-Zell-Aktivierung (Kostimulation).

Trifft eine naive T-Zelle auf eine Gewebezelle oder eine APZ, die das vom TZR erkannte Antigen in Abwesenheit von Liganden für kostimulatorische Rezeptoren präsentiert, so kommt es entweder zu keiner Aktivierung, zur langanhaltenden Inaktivierung (Anergie) oder zum Tod der Zelle. Trifft eine T-Zelle dagegen auf eine aktivierte APZ, die sowohl den kognaten MHC-Peptid-Komplex als auch kostimulatorische Liganden exprimiert, wird die T-Zelle aktiviert, proliferiert und differenziert zu einer Effektorzelle. Erkennung eines kostimulatorischen Liganden durch den entsprechenden Rezeptor auf der T-Zelle ohne gleichzeitige Stimulierung über den TZR bleibt ohne Auswirkung auf Aktivierung oder Aktivierbarkeit der T-Zelle.

Die physiologischen Liganden für CD28 sind die auf Antigen präsentierenden Zellen exprimierten Moleküle der B7-Familie B7-1 (CD80) (Freeman et al., 1989) und B7-2 (CD86) (Azuma et al., 1993). CD80 und CD86 sind ebenfalls Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie; sie enthalten sowohl eine Ig-V- als auch eine Ig-C-Domäne. Obwohl der zytoplasmatische Bereich von CD80, einem 60 kDa Glykoprotein, nur sehr kurz ist, scheint er für die kostimulatorische Funktion wichtig zu sein, denn CD80-Moleküle, denen die zytoplasmatische Domäne fehlt, sind nicht in der Lage, T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion zu kostimulieren (Doty und Clark, 1996). CD86 ist ein 70 kDa Glykoprotein mit einem längeren intrazellulären Bereich, der Phosphorylierungsstellen enthält, die auf eine mögliche signaltransduzierende Funktion von CD86 in APZ hindeuten (Freeman et al., 1993a; Freeman et al., 1993b).

Die selektive Expression von CD80 und CD86 stellt sicher, dass es nicht zu einer ungezielten T-Zell-Aktivierung kommt. Lediglich APZ sind in der Lage, B7-Moleküle zu exprimieren, Gewebezellen besitzen diese Moleküle nicht. Auch auf APZ ist die Expression der B7-Moleküle genau reguliert und erfolgt in der Regel erst nach Aktivierung der Zellen (zur Übersicht siehe Lenschow et al., 1996). Bereits konstitutiv höhere Mengen von B7-Molekülen auf ihrer Oberfläche besitzen reife Dendritische Zellen, die auch *in vitro* als am besten stimulierende Zellen imponieren (Larsen et al., 1994; zur Übersicht siehe Johnson und Jenkins, 1993). Dendritische Zellen zeigen im Vergleich mit anderen APZ die höchsten Mengen von B7-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Ein Vergleich der Expression von B7-1 zeigte z.B. eine ca. 40fach höhere Expression von B7-1 auf Dendritischen Zellen der Milz als auf aktivierten B-Zellen (Johnson und Jenkins, 1993). Ruhende B-Zellen besitzen nur sehr geringe Mengen von B7-1 und B7-2 auf der Zelloberfläche. Aktivierung durch Mitogen, B-Zell-Rezeptor-Kreuzvernetzung oder CD40-Ligation führt zur Hochregulation von B7-1, B7-2 oder beiden Molekülen (Lenschow et al., 1993). Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen führt ebenfalls zu einer Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2. Interessanterweise geschieht dies übereinstimmend auf verschiedenen Zelltypen mit einer distinkten Kinetik; die Induktion von B7-2 erfolgt in der Regel früher als die Induktion von B7-1 (zur Übersicht siehe Boussiotis et al., 1996).

Die Expression der kostimulatorischen Moleküle wird neben der Regulation durch Rezeptoren der natürlichen Immunität (siehe Kapitel 1.1.3) auch durch verschiedene Zytokine reguliert: IL-4 induziert die Expression von CD80 und CD86 auf B-Zellen, während IFN γ die Expression von CD86 sowohl auf B-Zellen als auch auf Monozyten induzieren kann. Das immunmodulierende Zytokin IL-10 hingegen supprimiert die Expression von CD80 und CD86 auf Peritonealmakrophagen sowie von CD86 auf Dendritischen Zellen (zur Übersicht siehe Slavik et al., 1999).

1.2.2 Effekte von CD28-Kostimulation in der T-Zell-Aktivierung

In Synergie mit einem TZR-vermittelten Signal verstärkt die Erkennung der natürlichen Liganden durch CD28 oder Kreuzvernetzung des CD28-Rezeptors durch spezifische Antikörper die Aktivierung, klonale Expansion und Zytokinproduktion von T-Zellen und verhindert die Induktion von Anergie und Apoptose (zur Übersicht siehe June et al., 1994). Aktivierte T-Zellen exprimieren den CD40-Liganden. Interaktion des CD40-Liganden mit CD40 auf APZ induziert die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 durch APZ und stellt so eine positiv verstärkende Schleife zwischen T-Zellen und APZ dar (zur Übersicht siehe Abbas und Janeway, Jr., 2000). Interaktion des CD40-Liganden mit CD40 auf B-Zellen und zytotoxischen T-Zellen liefert das für die Aktivierung dieser Zellen neben dem antigenspezifischen Signal notwendige "Signal 2" (zur Übersicht siehe Medzhitov und Janeway, Jr., 1996) und führt so zur Induktion von Effektormechanismen des Immunsystems. Ein besonders prominentes nach T-Zell-Aktivierung in Anwesenheit von Kostimulation produziertes Zytokin ist IL-2, ein T-Zell-Wachstumsfaktor (Linsley et al., 1991a). Gleichzeitig regulieren aktivierte T-Zellen den IL-2-Rezeptor hoch und werden so empfindlicher gegenüber IL-2 (Reiser et al., 1992). Stimulation durch IL-2 treibt T-Zellen zur Proliferation.

Durch welche intrazellulären Mechanismen CD28 die beobachteten Effekte hervorruft, ist bisher nicht genau bekannt. CD28-Aktivierung kann zu einer Verstärkung von durch den TZR eingeleiteten Signaltransduktionswegen führen. Diese Verstärkung führt möglicherweise zur Überschreitung einer für die Aktivierung und Einleitung von Effektorfunktionen entscheidenden Schwelle. Alternativ bzw. zusätzlich kann es zur Aktivierung von distinkten Signaltransduktionswegen kommen, die entweder weiter distal mit TZR-Signalen konvergieren oder von diesen unabhängig verlaufen. Für die Existenz von distinkten CD28-spezifischen Signaltransduktionswegen spricht, dass es mehrere Proteine zu geben scheint, die nach CD28-, aber nicht nach TZR/CD3-Ligation, phosphoryliert werden (zur Übersicht siehe Slavik et al., 1999).

Stimulation von CD28 durch Antikörper führt zur Phosphorylierung von Tyrosinen im zytoplasmatischen Anteil von CD28, möglicherweise durch Kinasen der Src-Familie (Hutchcroft und Bierer, 1994; Raab et al., 1995). Phosphorylierte Tyrosine können dann Bindungsstellen für verschiedene Adapterproteine darstellen, welche die Aktivierung von MAP-Kinasen-Wegen (MAP = Mitogen-aktiviertes Protein) induzieren, was zur Bildung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren führt (Slavik et al., 1999). Das Adapterprotein Grb-2 kann zum intrazellulären Bereich von CD28 rekrutiert werden und über SOS zur Aktivierung von Ras führen (Schneider et al., 1995). Der intrazelluläre Bereich von CD28 enthält ein YxxM-Motiv, an das sowohl Grb-2 als auch PI-3-Kinase binden können (Songyang et al., 1993). Die weiter distalen Ereignisse in Folge einer Aktivierung von PI-3-Kinase sind weitgehend unklar, ebenso wie die Folgen einer Aktivierung der Tyrosinkinase Itk, von der gezeigt ist, dass CD28-Stimulation zu ihrer Phosphorylierung und Assoziation mit CD28 führt (August et al., 1994; Slavik et al., 1999). Nunes *et al.* beobachteten nach CD28-Bindung durch B7-1 und B7-2 keine Regulierung

von Grb-2-Komplexen, so dass die Bedeutung von Grb-2 in der CD28-Signaltransduktion bisher nicht geklärt ist. Eine alternative Verbindung zur Aktivierung des Ras-Weges stellt das Adapterprotein p62 dar. P62 wurde in vielen verschiedenen Rezeptorsystemen, allerdings nicht in der TZR-Signaltransduktion, als Adaptermolekül identifiziert, und auch die Bindung von B7-1 und B7-2 an CD28 induziert die Tyrosinphosphorylierung von p62 in T-Zellen (Nunes et al., 1996).

Die Regulation der Zytokinproduktion durch CD28 erfolgt auf zwei Ebenen. Zum einen besitzen die Boten-Ribonukleinsäuren (mRNS) von mehreren Zytokinen, die von aktivierten T-Zellen sezerniert werden (wie IL-2, TNF α , GM-CSF und IFN γ), eine konservierte AU-reiche Sequenz in ihrer 3'-untranslatierten Region, welche die mRNS instabil macht und zu deren schneller Degradierung führt. Aktivierung über CD28 erhöht die Produktion dieser Zytokine durch selektive Stabilisierung der Zytokin mRNS und Verlängerung ihrer Halbwertszeit. Ferner erhöht CD28 auch die Transkription von Zytokinen über verschiedene, teils vom TZR bekannte intrazelluläre Signaltransduktionswege, die letztlich zur Bildung oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Fos, C-jun und ATF-2 führen (Slavik et al., 1999).

Innerhalb der Promotoren der Gene für IL-2, IL-3, IL-8 und RANTES befindet sich eine mit der NF κ B-Bindungsstelle verwandte Sequenz, die als CD28-responsives Element (CD28RE) bezeichnet wird. An diese Sequenz bindet der CD28-responsive Komplex (CD28RC). Dies ist ein Multikomponenten-Protein-Komplex, in dem unter anderem p50, p65 und c-Rel sowie ATF-1 und CREB-2 zu finden sind. Bindung des Komplexes an das CD28RE führt zur Transkription der entsprechenden Gene (zur Übersicht siehe Ward, 1996).

Neben Zytokin-Genen werden durch CD28-Aktivierung auch anti-apoptotische Gene induziert. CD28-Aktivierung führt zu einer Hochregulation von bcl-xl (Boise et al., 1995) und bcl-xy (Yang et al., 1997), welche die T-Zelle vor Fas-induzierter Apoptose und damit vor Aktivierungs-induziertem Zelltod schützen.

Im Gegensatz zum TZR-Signal scheint das CD28-Signal Cyclosporin-resistent zu sein. Dieser Beobachtung stehen allerdings einige Berichte, die für CD28 eine Aktivierung von PLC γ 1 zeigen, entgegen. PLC γ 1 führt über die Aktivierung von IP3 zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und dadurch zur Aktivierung von Calcineurin, welches durch Cyclosporin gehemmt wird. Die Aufdeckung der Mechanismen der CD28-Signaltransduktion ist besonders schwierig, weil es in der Regel nicht möglich ist, CD28-vermittelte Effekte in Abwesenheit eines TZR-vermittelten Stimulus zu betrachten. Daher kann es problematisch sein, die jeweils durch den T-Zell- und den CD28-Stimulus verursachten Effekte voneinander zu differenzieren. Darüber hinaus haben offensichtlich unterschiedliche Antikörper sowie die zwei physiologischen Liganden B7-1 und B7-2 nicht nur quantitativ unterschiedliche Effekte, sondern können zum Teil verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren. Dies hat möglicherweise wichtige Funktionen *in vivo*. So gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivierung durch B7-1 die Ausbildung einer T_H1-Antwort und die Aktivierung über B7-2 die Ausbildung einer T_H2-Antwort begünstigt (Freeman et al., 1995; Slavik et al., 1999).

1.2.3 Anergie

T-Zellen, die Signal 1 in Abwesenheit von Signal 2 erhalten, können in einen langanhaltenden Zustand mangelnder Reaktionsfähigkeit eintreten (Anergie), der möglicherweise eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz spielt (Boussiotis et al., 1994). Signaltransduktion durch den CD28-Rezeptor kann die Induktion dieses anergen Zustands *in vitro* verhindern (Harding et al., 1992). Die Ausbildung von Anergie erfordert Aktivierung von Proteinkinasen, Calcium-Mobilisierung und Proteinsynthese, da sie sich durch CyclosporinA und Proteinsynthese-Inhibitoren verhindern lässt (Jenkins et al., 1987; Quill und Schwartz, 1987). Anergie-Induktion scheint daher ein aktiver biochemischer Vorgang zu sein, der infolge einer TZR-Stimulation eintritt. Es ist unklar, ob der anerge Zustand in Abwesenheit von Kostimulation deswegen eintritt, weil kein ausreichendes positives Signal vorhanden ist, oder durch die Aktivierung eines distinkten Weges eingeleitet wird. *In vitro* lässt sich auch bei Anwesenheit eines CD28-Kostimulus T-Zell-Anergie induzieren, wenn während der Kultur von T_H1-Zellen anti-IL-2-AK und anti-IL-2-Rezeptor-AK zugegeben werden (DeSilva et al., 1991). In der Abwesenheit von B7-Kostimulation kann die Induktion von Anergie durch Zugabe von exogenem IL-2 zur Kultur verhindert werden (Essery et al., 1988). Dieser Effekt scheint durch die gemeinsame γ -Kette des IL-2-Rezeptors vermittelt zu sein, da verschiedene Zytokine, die über die gemeinsame γ -Kette signalisieren (IL-2, IL-4, IL-7 und IL-15) ebenso wie Kreuzvernetzung der gemeinsamen γ -Kette durch monoklonale Antikörper in der Lage sind, die Induktion von Anergie zu verhindern. CD28-Kostimulation führt sowohl zur Produktion von IL-2 als auch zur Hochregulation der gemeinsamen γ -Kette des IL-2-Rezeptors (Freeman et al., 1995). Die Verhinderung von Anergie durch CD28-Kostimulation ist daher möglicherweise ein indirekter Effekt: Die Signaltransduktion über CD28 entscheidet, ob ausreichend IL-2 für ein Anergie verhinderndes Signal produziert und "erkannt" wird (zur Übersicht siehe Boussiotis et al., 1996). Obwohl "Anergie" ein seit langem diskutierter Begriff ist und die Induktion von Anergie in Abwesenheit von Kostimulation in vielen *in vitro* Modellen gezeigt wurde, ist nicht sicher, ob es auch *in vivo* zur Ausbildung von Anergie kommt. Daher bleibt die physiologische Bedeutung von Anergie umstritten.

1.2.4 Generierung eines CD28-defizienten Mausstamms

Zur Analyse der Funktionen von CD28 *in vivo* wurde durch gezielte Keimbahn-Mutagenese ein CD28-defizienter Mausstamm generiert. Mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren wurde dazu ein Gensegment (3'-Ende des Intron 1 und 5'-Region des Exon 2) durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt und diese Mutation durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht (Shahinian et al., 1993). Aus diesen wurden CD28-defiziente Mäuse erzeugt, indem die Mutation enthaltende embryonale Stammzellen in eine Blastozyste injiziert wurden und diese dann in den Uterus eines pseudoschwangeren Weibchens transferiert wurde. Die mutierten ES-Zellen und die Zellen der Blastozyste differenzieren zu verschiedenen Zelltypen

aus, und es entstehen chimäre Mäuse, die neben normalen Zellen auch Zellen mit dem mutierten Genlocus besitzen. Wenn eine Chimäre den mutierten Genlocus in Keimzellen besitzt, können durch Verpaarung mit einer Wildtyp-Maus in allen Zellen heterozygot defiziente Nachkommen generiert werden. Diese werden untereinander verpaart, um homozygot genetisch veränderte Nachkommen zu erhalten (Thomas und Capecchi, 1990).

Periphere Blut-Leukozyten derartig erzeugter Mäuse mit einem mutierten CD28-Lokus wurden durch durchflußzytometrische Untersuchung auf ihre Oberflächenexpression von CD28 untersucht. Leukozyten von homozygot mutierten Mäusen zeigten keine, heterozygote Mäuse eine herabgesetzte Expression von CD28. Hierdurch wird bestätigt, dass das Ersetzen eines Gensegments durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette tatsächlich dazu geführt hat, dass CD28 als Protein nicht mehr vorhanden ist (Shahinian et al., 1993).

1.2.5 Beeinträchtigung der T-Zell-Aktivierung in Abwesenheit von CD28

In vitro sind T-Zellen CD28-defizienter Mäuse verglichen mit Wildtyp-Kontroll-Zellen deutlich schlechter aktivierbar. Nach Stimulation mit Concanavalin A (ConA) ist die Produktion von IL-2 verglichen mit Wildtyp-Kontroll-Zellen in den CD28-defizienten Zellen um ca. 75% und in heterozygoten Zellen um ca. 25% reduziert. Die Proliferation von CD28-defizienten Zellen nach Stimulation mit ConA gemessen an der ^3H Thymidinaufnahme zeigt sich ebenfalls deutlich reduziert. Die Reaktionsfähigkeit von CD28-defizienten T-Zellen lässt sich zumindest teilweise durch Zugabe von exogenem IL-2 wiederherstellen. Die Reaktion von CD28-defizienten Zellen auf Stimulation durch eine Kombination des Phorbol-ester PMA mit Ionomycin, Substanzen, die ohne Vermittlung von Zelloberflächenrezeptoren zu einer Aktivierung führen, ist dagegen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nicht verändert (Shahinian et al., 1993). Die Proliferation nach Aktivierung durch Antigen-präsentierende oder B7-transfizierte Zellen ist ebenfalls vermindert (Green et al., 1994).

In vivo ist der Phänotyp CD28-defizienter Mäuse überraschend mild. CD28-defiziente Mäuse zeigen eine normale B- und T-Zell-Entwicklung. Die basalen Immunglobulin-Spiegel sind auf ca. 20% der bei Kontrollmäusen gemessenen Werte reduziert, wobei die Isotypen IgG1 und IgG2b um ca. 85% bzw. 90% verringert, IgG2a um 20% erhöht und IgM und IgG3 unverändert sind. Untersuchungen in Virusinfektionsmodellen zeigen, dass CD28^{-/-}-Mäuse bei Infektion mit dem *lymphozytären Choriomeningitis-Virus* (LCMV) normal reaktive virusspezifische zytotoxische T-Zellen ausbilden. Nach Infektion mit dem *vesikulären Stomatitis-Virus* (VSV) lassen sich in CD28^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontroll-Mäusen unveränderte anti-VSV-IgM-Titer nachweisen, die neutralisierenden Antikörper vom IgG-Subtyp sind jedoch reduziert (Shahinian et al., 1993). In Abwesenheit von CD28 scheint also eine im wesentlichen normale CD8-Antwort sowie primäre Antikörper-Produktion möglich, aber insbesondere der von T-Helferzellen abhängige Klassenwechsel beeinträchtigt zu sein. Entsprechend zeigt sich auch nach Infektion mit

dem Nematoden *Heligmosoides polygyrus* ein abgeschwächter Klassenwechsel zu IgE sowie eine abgeschwächte B-Zell-Aktivierung (Lu et al., 1994).

1.2.6 CTLA-4: Ein Bindungspartner von B7-1/B7-2 mit inhibitorischer Funktion

Das System der Kostimulation durch Mitglieder der B7-Familie ist komplizierter als zunächst angenommen: Mit CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*) existiert ein weiterer Ligand für B7-1 und B7-2 (Brunet et al., 1987). Trotz seiner hohen Homologie zu CD28 (27% bis 31% [murin bzw. human] auf Aminosäurenebene) unterscheidet sich CTLA-4 sowohl in seinem Expressionsmuster als auch funktionell stark von CD28 (zur Übersicht siehe McCoy und Le Gros, 1999). Ebenso wie CD28 ist CTLA-4 ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und in der Regel als durch Disulfid-Brücken verbundenes Homodimer auf der Zelloberfläche von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert (zur Übersicht siehe Balzano et al., 1992). Im Gegensatz zu CD28 wird CTLA-4 erst nach Aktivierung der Zellen hochreguliert und ist auf der Oberfläche ruhender T-Zellen allenfalls in sehr geringen Mengen nachzuweisen (Freeman et al., 1992; Linsley et al., 1992a). Ein deutlicher Unterschied findet sich auch in den Bindungscharakteristika: CTLA-4 bindet mit ca. 20fach höherer Affinität an Moleküle der B7-Familie als CD28 (Linsley et al., 1991b).

Funktionell ist CTLA-4 ein negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung. *In vitro* kann durch Antikörper-vermittelte Kreuzvernetzung von CTLA-4 die T-Zell-Aktivierung inhibiert werden; Zugabe von gegen CTLA-4 gerichteten nicht-kreuzvernetzenden F(ab)₂-Fragmenten hingegen kann die T-Zell-Aktivierung in Anwesenheit von APZ verstärken (zur Übersicht siehe Scheipers und Reiser, 1998). Den direkten Nachweis einer Rolle von CTLA-4 in der negativen Regulation der T-Zell-Aktivierung und Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts brachte der Phänotyp von CTLA-4-defizienten Mäusen. Diese Mäuse entwickeln spontan eine fatale lymphoproliferative Erkrankung mit lymphozytären Infiltraten und Gewebeerstörungen in vielen Organen und versterben wenige Wochen nach der Geburt. Periphere T-Zellen aus CTLA-4-defizienten Mäusen sind aktiviert, proliferieren *in vitro* bereits ohne Stimulation und produzieren hohe Mengen an Zytokinen (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995).

Zur *in vivo* Blockade von B7-CD28-Interaktionen wurde ein CTLA-4-Ig-Fusionsprotein konstruiert, welches aus dem extrazellulären Bereich von CTLA-4 und dem Fc-Teil der schweren Kette eines Immunglobulin-Moleküls besteht (Linsley et al., 1992b). CTLA-4-Ig blockiert die Interaktion beider B7-Moleküle mit CD28 und CTLA-4 und kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur Untersuchung und gezielten Beeinflussung der CD28/CTLA-4-abhängigen Immunregulation eingesetzt werden. Die sehr viel höhere Bindungsaffinität von CTLA-4 an B7-Moleküle im Vergleich zu CD28 ermöglicht eine besonders effektive Blockade der CD28/B7-Interaktion. Ein wesentliches potentiell Einsatzgebiet ist dabei die Transplantation.

1.3 TRANSPLANTATION

Beim Versagen eines lebenswichtigen Organs ist eine Organtransplantation für den betroffenen Patienten häufig entweder die einzige Überlebenschance oder eine Möglichkeit, die Lebensqualität entscheidend zu verbessern. Bei Ausfall der Nierenfunktion oder der endokrinen Pankreasfunktion bestehen in Dialyse und Insulintherapie alternative Therapiemöglichkeiten. Die Funktion anderer Organe wie Leber, Lunge und Herz lässt sich dagegen bisher nicht oder allenfalls zur zeitlich begrenzten Überbrückung durch technische Hilfsmittel ersetzen, so dass die Transplantation von Organen von Lebend- oder Kadaverspendern hier die einzige Therapiemöglichkeit bietet (zur Übersicht siehe Bush, 1999). Sofern nicht genetisch identisches Gewebe transplantiert wird, kommt es dabei unweigerlich zu einer heftigen Reaktion des Immunsystems gegen das fremde Gewebe und ohne immunsuppressive Therapie in jedem Fall zur Abstoßung und damit zum Verlust des transplantierten Organs (zur Übersicht siehe Denton et al., 1999). Die Fortschritte der letzten 40 Jahre in der immunsuppressiven Therapie haben Organtransplantationen zu regelmäßig angewandten klinischen Therapien gemacht und ermöglichen Patienten mit schweren Nieren-, Leber, Lungen- und Herzerkrankungen heute ein längeres Leben und eine höhere Lebensqualität. Die kurzzeitigen Ergebnisse der Organtransplantation sind beeindruckend, und die 1-Jahres-Überlebensrate von transplantierten Nieren, Herzen und Lebern liegt heute in den meisten Zentren zwischen 80 und 90% (UNOS, 2000). Langzeit-Transplantat-Überleben bleibt dagegen weiter ein entscheidendes Problem, so liegt z.B. die 10-Jahres-Überlebensrate von Herztransplantaten nur bei weniger als 50% (Hosenpud et al., 1999). Die häufig nebenwirkungsreichen immunsuppressiven Medikamente müssen in der Regel lebenslang eingenommen werden. Außerdem besitzen die derzeitigen Therapieschemata keinerlei Spezifität, so dass eine ausreichende Immunsuppression zur Verhinderung der Transplantatabstoßung immer mit einer entsprechenden erhöhten Suszeptibilität des Patienten gegenüber Infektionen und bestimmten, vor allem viral induzierten, Tumorerkrankungen erkauft wird. Dies ist mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität assoziiert (Haeney, 1995; Abbas et al., 2000c).

Auch wenn sich akute Abstoßungsepisoden heute in der Mehrzahl der Fälle durch prompt intensive immunsuppressive Therapie beherrschen lassen, stellen sie einen Faktor dar, der zur Ausbildung einer chronischen Abstoßungsreaktion prädisponiert (Almond et al., 1993). Die Suche nach neuen, besseren immunsuppressiven Therapiemöglichkeiten ist daher keineswegs abgeschlossen. Ziel ist letztlich die Induktion von spezifischer Toleranz gegenüber dem transplantierten Gewebe durch eine zeitlich begrenzte Behandlung, die frei von wesentlichen Nebenwirkungen ist (Denton et al., 1999).

1.3.1 Mechanismen der Transplantatabstoßung

T-Zellen besitzen eine zentrale Rolle in der Ausbildung einer Immunantwort gegen Allotransplantate. Zahlreiche Untersuchungen sowohl an transplantierten Organen beim Menschen als auch in verschiedenen Tiermodellen zeigen eine Einwanderung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in das Transplantat im Verlauf von Abstoßungsreaktionen (Hall, 1987; zur Übersicht: Binah, 1994). In experimentellen Tiermodellen mit kongenitalen oder induzierten T-Zell-Defizienzen (z.B. athymische oder neonatal thymektomierte Mäuse) oder kombinierten B- und T-Zell-Defekten (SCID- oder $Rag^{-/-}$ -Mäuse) werden allogene Organtransplantate akzeptiert (Shelton et al., 1992; Hutchinson, 1996; zur Übersicht: Perico und Remuzzi, 1997). Die relative Bedeutung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der Abstoßungsreaktion differiert in Abhängigkeit vom transplantierten Gewebe. In Herztransplantationsmodellen sind $CD4^+$ T-Zellen sowohl hinreichend als auch notwendig zur Abstoßung der Transplantate (Krieger et al., 1996; Pietra et al., 2000), Hauttransplantate können jedoch auch durch $CD8^+$ T-Zellen allein effektiv abgestoßen werden (Trambley et al., 1999). $CD4^+$ T-Zellen spielen sowohl in der Initiierung als auch in der Koordination einer Abstoßungsreaktion eine wesentliche Rolle (Abbildung 1.5). Die Erkennung von Alloantigenen durch T-Helferzellen kann direkt, d.h. durch Erkennung intakter MHC-Klasse-II-Moleküle auf den Donor-Zellen, oder indirekt erfolgen. Unter indirekter Alloerkennung versteht man, dass vom Transplantatgewebe stammende Proteine, die zwischen Spender und Empfänger differieren, von Antigen präsentierenden Zellen des Empfängers prozessiert und als Peptide im Kontext mit Selbst-MHC präsentiert werden (zur Übersicht: Sayegh et al., 1994; Gould und Auchincloss, Jr., 1999). Direkte Alloerkennung kann einen erheblich größeren Anteil der peripheren T-Zellen aktivieren, als dies bei Immunantworten gegen konventionelle Antigene der Fall ist: Zwischen 1% und 10% der T-Zellen im peripheren Blut sind in der Lage, ein bestimmtes Alloantigen zu erkennen (Wilson und Nowell, 1971; Jones, 1973; zur Übersicht: Krensky et al., 1990). Möglicherweise ist dies für die besonders starke Immunantwort, die in der akuten Abstoßung beobachtet wird, verantwortlich (Liu et al., 1993). Indirekte Alloerkennung generiert eine kleinere Anzahl an alloreaktiven T-Zell-Klonen, und es gibt Hinweise darauf, dass dieser Mechanismus zu der schleichenden Immunantwort führt, die in der chronischen Abstoßung auftritt (Vella et al., 1997). Wie in Kapitel 1.2 erläutert, ist neben der Erkennung von Alloantigenen durch den TZR ein kostimulatorisches Signal für die Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen erforderlich. Alloaktivierte T-Helferzellen interagieren dann mit Effektorzellen des Immunsystems durch Zytokinproduktion oder direkte Zell-Zell-Kontakte. Durch die Aktivierung von B-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen fördern alloaktivierte $CD4^+$ T-Zellen die Produktion von Alloantikörpern, antigenspezifische Zellyse und Gewebeschädigung im Sinne einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion. Das Zusammenspiel dieser Effektormechanismen resultiert schließlich in der Zerstörung des Transplantats (zur Übersicht siehe Denton et al., 1999).

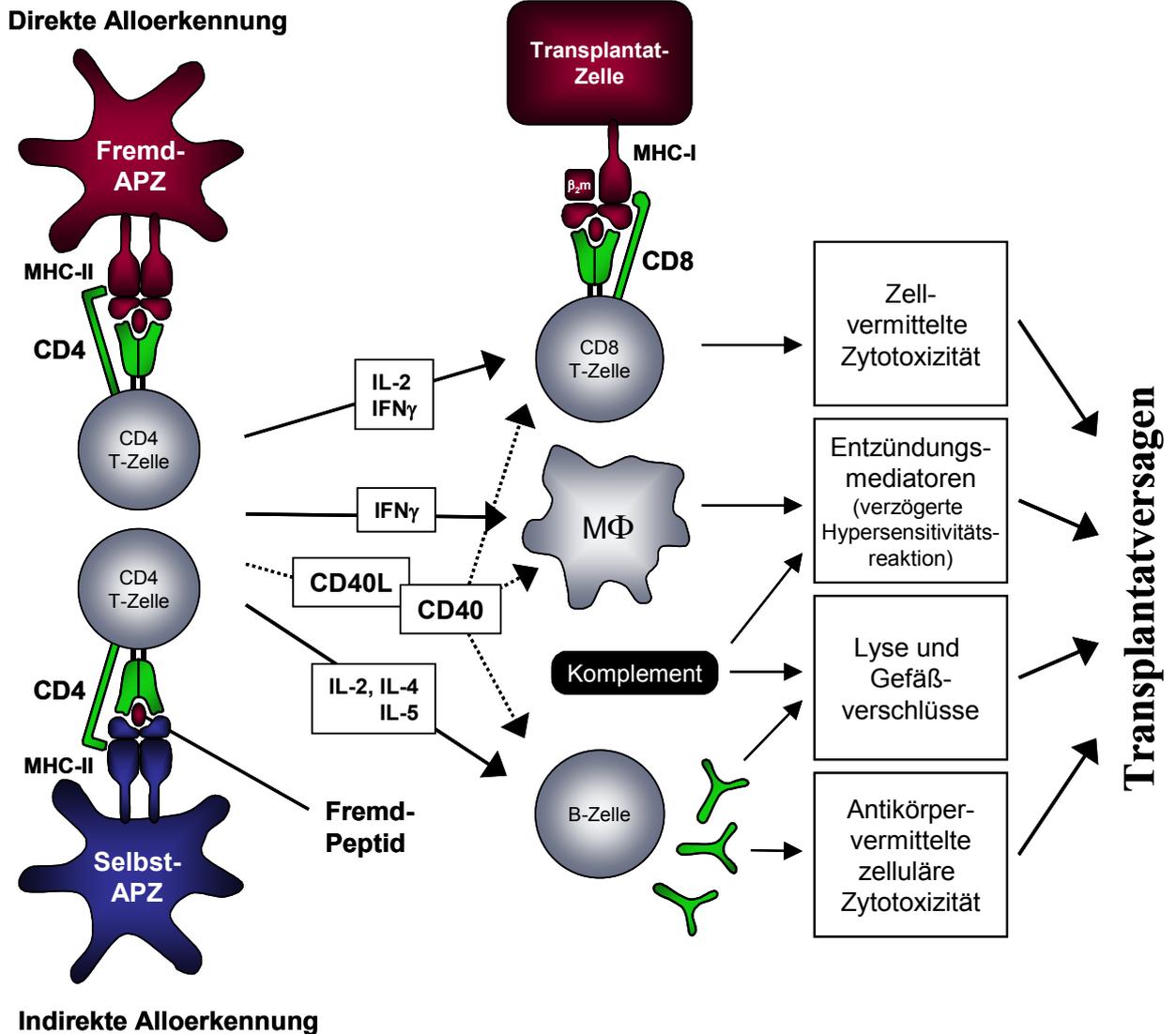


Abbildung 1.5: Mechanismen der Transplantatabstoßung.

Direkte oder indirekte Alloerkennung (im Zusammenhang mit Kostimulation, hier nicht dargestellt) führt zur Aktivierung von T-Helferzellen. Diese aktivieren daraufhin zytotoxische T-Zellen zur Zerstörung von Fremd-Gewebe durch Perforin-vermittelte Lyse oder Induktion von Apoptose. Gleichzeitig werden durch freigesetzte Zytokine Makrophagen rekrutiert und aktiviert, die wiederum Entzündungsmediatoren freisetzen, die Gewebe schädigen und zur weiteren Aktivierung von T-Zellen beitragen. B-Zellen werden aktiviert und produzieren Alloantikörper, die zur Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität und zur Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg führen. Komplement-Aktivierung resultiert in der direkten Zellzerstörung durch Ausbildung des Membran-Attack-Komplexes sowie in der Freisetzung einer Reihe von Entzündungsmediatoren und chemotaktisch wirkenden Substanzen. Aktivierung von Effektorzellen durch CD40L/CD40-Interaktionen ist gestrichelt dargestellt (Modifiziert nach Binah, 1994 und Denton et al. 1999).

In bezug auf den zeitlichen Ablauf unterscheidet man zwischen hyperakuter, akuter und chronischer Transplantatabstoßung. Hyperakute Abstoßung führt innerhalb von Sekunden bis wenigen Stunden durch präformierte Antikörper, z.B. durch Blutgruppeninkompatibilität oder vorherigen Kontakt des Empfängers mit Fremd-MHC, zu Gefäßverschlüssen und zum irreversiblen Transplantatverlust. Akute Abstoßung tritt innerhalb von Wochen bis Monaten nach der Transplantation auf und führt über die oben erläuterten Mechanismen zu einer massiven Infiltration von Entzündungszellen und zur Zerstörung des Transplantats. Chronische Abstoßung ist initial schwach, wird jedoch im Verlaufe der Zeit stärker und kann über mehrere Jahre progredient

verlaufen. Die Mechanismen der chronischen Transplantatabstoßung sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung; im Gegensatz zur akuten Abstoßung scheint die humorale Immunität hier eine wichtige Rolle zu spielen (Russell et al., 1994). Charakteristische Auswirkungen der chronischen Transplantatabstoßung sind Gewebefibrosierung sowie Gefäßverengungen und -verschlüsse; dies wird auch als Transplantatvaskulopathie bezeichnet (zur Übersicht siehe Binah, 1994).

1.3.2 Überblick über immunsuppressive Therapiemöglichkeiten in der Transplantationsmedizin

Die zur Zeit in der Transplantation verwendeten immunsuppressiven Medikamente interferieren mit der T-Zell-Aktivierung, der Zytokinproduktion, der klonalen Expansion von Lymphozyten, oder einer Kombination dieser Mechanismen (Abbildung 1.6). Neben chemotherapeutischen Medikamenten werden zur immunsuppressiven Therapie Antikörper eingesetzt, die Lymphozyten oder Lymphozyten-Subpopulationen depletieren oder die Interaktion von bestimmten Oberflächenmolekülen verhindern sollen (Denton et al., 1999).

1.3.2.1 Chemotherapeutische Immunsuppression

Calcineurin-Inhibitoren

Calcineurin-Inhibitoren bilden heute in der Regel den Eckpfeiler der immunsuppressiven Therapie in der Transplantationsmedizin. Sowohl CyclosporinA als auch die neuere Substanz Tacrolimus (FK506) binden an zytoplasmatische Rezeptoren (Cyclophilin bzw. FKBP-12), und die gebildeten Komplexe hemmen die Aktivierung von Calcineurin, einer wichtigen Phosphatase in der TZR-Signaltransduktion, welche die zytoplasmatische Untereinheit von NFAT dephosphoryliert. Dephosphoryliertes NFAT kann in den Kern translozieren und verbindet sich dort mit der nukleären Untereinheit von NFAT zum aktiven Transkriptionsfaktor. Durch Interferenz mit der Aktivierung von Calcineurin inhibiert CyclosporinA so die Transkription einer Reihe von Zytokinen, u.a. IL-2, und anderen Proteinen, die eine Rolle in der T-Zell-Aktivierung und Proliferation spielen (zur Übersicht: Perico und Remuzzi, 1997; Bush, 1999).

Antiproliferativ wirksame Immunsuppressiva

Antimetaboliten wie Azathioprin, Mykophenolat-Mofetil und die sich zur Zeit noch im experimentellen Stadium befindenden Malonitriloamide interferieren mit der DNA-Synthese und inhibieren so die Zell-Proliferation von B- und T-Zellen. Die therapeutischen Effekte von Azathioprin werden durch den aktiven Metaboliten 6-Mercaptopurin, ein Purin-Analog, vermittelt. Der Vorteil von Mykophenolat-Mofetil und den Malonitrilonamiden liegt darin, dass diese durch Interferenz mit der *de novo* Purin- bzw. Pyrimidin-Synthese spezifischer auf B- und T-Zellen wirken. Andere Zelltypen des Organismus können Salvage-Wege für die Purin- und Pyrimidin-Synthese verwenden, während aktivierte Lymphozyten beide Wege der Synthese benötigen und daher abhängiger von der *de novo* Synthese sind (zur Übersicht: Bush, 1999;

Gummert et al., 1999). Sirolimus (Rapamycin) inhibiert die Proliferation von Lymphozyten vermutlich durch mehrere Mechanismen. Ebenso wie Tacrolimus bindet es an das zytoplasmatische Protein FKBP-12, allerdings sind die darauf folgenden Wirkmechanismen dieser beiden Komplexe unterschiedlich. Unter anderem interferiert Sirolimus mit der Signaltransduktion über den IL-2-Rezeptor und hemmt so die Stimulation von Lymphozyten durch IL-2 (zur Übersicht: Denton et al., 1999; Gummert et al., 1999). Im Gegensatz zu Cyclosporin und Tacrolimus hemmt Sirolimus auch die Immunglobulinproduktion durch B-Zellen, Antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität sowie natürliche Killerzellen (Chen et al., 1993; Thomson et al., 1993).

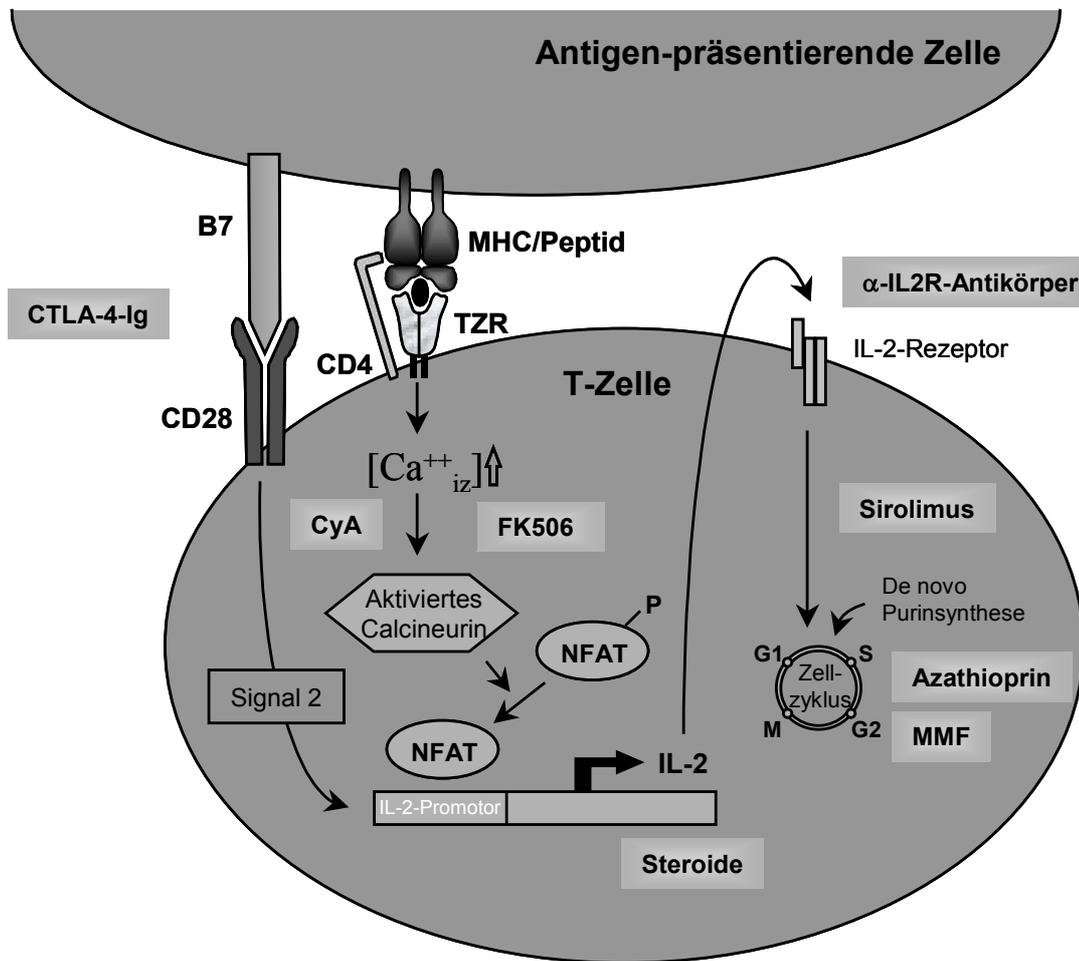


Abbildung 1.6: Zielstrukturen immunsuppressiver Substanzen.

Stimulation über den TZR resultiert in Calcineurin-Aktivierung. Dieser Prozess wird durch CyclosporinA und FK506 inhibiert. Calcineurin dephosphoryliert NFAT (nuclear factor of activated T cells), so dass es in den Nukleus translozieren und an den IL-2 Promotor binden kann. Steroide inhibieren die Zytokintranskription sowohl in Lymphozyten als auch in Antigen-präsentierenden Zellen über mehrere Mechanismen. Experimentelle Therapien (z.B. durch CTLA-4-Ig) zielen auf die Blockade des für die T-Zell-Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Signals ab. Stimulation über den IL-2R aktiviert T-Zellen zum Eintritt in den Zellzyklus und zur Proliferation. Dieses Signal kann durch anti-IL-2R-Antikörper sowie intrazellulär durch Sirolimus (Rapamycin) blockiert werden, welches in die Signaltransduktion eingreift. Azathioprin und Mykophenolat-Mofetil (MMF) verhindern Proliferation durch Inhibition der für die DNA-Replikation notwendigen Purin-Synthese.

Kortikosteroide

Kortikosteroide sind unspezifische antiinflammatorische Substanzen. Sie hemmen die Zytokinproduktion von T-Zellen und Makrophagen und durchbrechen dadurch die Aktivierung anderer Immunzellen und die Makrophagen-vermittelte Gewebeerstörung. Diese Effekte werden durch die Inhibition der NF κ B-Aktivierung (Scheinman et al., 1995) sowie durch Bindung an Glukokortikoid-responsive Elemente in den Promotorregionen verschiedener Zytokine vermittelt. Aufgrund der Vielzahl bekannter Nebenwirkungen von Kortikosteroiden wird gegenwärtig versucht, die Steroidmedikation einige Zeit nach der Transplantation aus der immunsuppressiven Therapie auszuschleichen. Endgültige Ergebnisse hinsichtlich des Risikos akuter Abstoßungsperioden sowie der Langzeitergebnisse bei Ausschleichen im Vergleich zum Beibehalten der Kortikoidmedikation müssen noch abgewartet werden (Denton et al., 1999).

1.3.2.2 Immunsuppression durch Antikörper

In der Transplantationsmedizin können Antikörper eingesetzt werden, um Lymphozyten oder Lymphozyten-Subpopulationen zu depletieren oder um die Interaktionen von speziellen Oberflächenmolekülen zu blockieren. Bereits am längsten bekannt und verwendet ist Antithymozytenglobulin, ein polyklonales Pferdeserum, das durch Aufreinigung von Pferde-Immunglobulin nach Immunisierung mit humanem lymphatischem Gewebe gewonnen wird. Es wird angenommen, dass die therapeutischen Effekte von Antithymozytenglobulin durch die Depletion von T-Lymphozyten durch Opsonisierung und Sequestrierung in das lymphoretikulozytäre System und Komplement-vermittelte Lyse zu erklären sind (Young und Speck, 1984). Alternativ schlugen Merion *et al.* vor, dass die immunsuppressiven Effekte durch partielle Aktivierung von T-Zellen und Induktion von Anergie zustände kommen (Merion et al., 1998). Da bei der Verwendung von equinem Antithymozytenglobulin große Mengen von Fremd-Immunglobulin in den Körper eingebracht werden, kann es zu gravierenden Nebenwirkungen bis hin zu Anaphylaxie und Serum-Krankheit kommen (zur Übersicht: Bush, 1999; Denton et al., 1999). Die meisten heute verwendeten Antikörper sind biotechnologisch hergestellte monoklonale Antikörper, z.B. OKT3, ein gegen humanes CD3 gerichteter muriner Antikörper, der insbesondere in der Therapie akuter Abstoßungsperioden zur Depletion von CD3⁺ Zellen verwendet wird. Neben den allgemein mit Antikörper-Therapien assoziierten Nebenwirkungen kann es bei der Verwendung von OKT3 zum sogenannten Zytokin-Freisetzungssyndrom kommen, welches durch die massive Freisetzung von Zytokinen durch Aktivierung der T-Zellen über den CD3-Rezeptor zustande kommt. Neuere Ansätze in der Antikörpertherapie bestehen in der Humanisierung von Antikörpern zur Verringerung von Anti-Antikörper-Reaktionen sowie in der gezielten Blockierung von einzelnen Molekülen. Es werden zwei solcher humanisierter bzw. chimärer Antikörper eingesetzt, die gegen die CD25-Untereinheit des IL-2-Rezeptors gerichtet sind. Diese Antikörper sollen ihre Effekte durch Blockierung der IL-2-vermittelten Aktivierung und Proliferation von T-Zellen vermitteln (zur Übersicht: Schena, 1997; Bush, 1999). Alternativ können die durch anti-IL-2R-Antikörper beobachteten Effekte auch durch Depletion von

aktivierten T-Zellen, die den IL-2-Rezeptor hochreguliert haben, erklärt werden (zur Übersicht siehe Breedveld, 2000).

Roy Calne entwickelte das Konzept der „Prope“ Toleranz: Ziel ist dabei, einen nahezu (lateinisch prope) toleranten Zustand zu erreichen, in dem die Akzeptanz des Organtransplantats durch nebenwirkungsarme, niedrig dosierte immunsuppressive Monotherapie aufrechterhalten werden kann. Die Patienten erhalten zweimalig perioperativ Campath H1, einen humanisierten monoklonalen Antikörper mit Spezifität gegen das auf Lymphozyten und Monozyten exprimierte Molekül CD52. Dadurch werden die Anzahlen von B- und T-Zellen um ein bis zwei Log-Stufen reduziert. Anschließend wird am Tag 3 nach der Transplantation eine niedrigdosierte Therapie mit CyclosporinA begonnen. Die bisherigen Ergebnisse bei 31 nierentransplantierten Patienten sind vielversprechend. Die Wirksamkeit dieser Therapie bei der Nierentransplantation wird derzeit in einer kontrollierten klinischen Studie mit der konventionellen Dreifach-Therapie verglichen (Calne et al., 1998; Calne et al., 1999).

Ebenfalls zur Zeit noch im experimentellen Stadium befinden sich Antikörper-Therapien zur Blockade von Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen sowie gegen CD4-Moleküle gerichtete Antikörper (zur Übersicht: Denton et al., 1999; Gudmundsdottir und Turka, 1999).

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Kostimulationsblockade stellt einen besonders vielversprechenden Ansatz der immunsuppressiven Therapie in der Transplantation dar. Insbesondere die Beobachtung, dass in einigen Tiermodellen die kurzzeitige Administration von CTLA-4-Ig zum Zeitpunkt der Transplantation zu einem verlängerten Transplantat-Überleben führte, ließ hoffen, dass sich durch diesen Ansatz spezifische Toleranz induzieren lässt und sich damit die derzeitigen gravierenden Nachteile einer lebenslangen immunsuppressiven Therapie vermeiden lassen (Pearson et al., 1994; zur Übersicht: Gudmundsdottir und Turka, 1999).

Überraschenderweise stoßen CD28-defiziente Mäuse allogene Herztransplantate lediglich gering verzögert ab (Abbildung 2.1A) (Lin et al., 1998; Maier, 1999). Auch in experimentellen Transplantationsmodellen mit Kostimulationsblockade zeigte sich, dass allogene Transplantate dennoch effizient abgestoßen werden können (zur Übersicht siehe Dharnidharka et al., 2000). Die zugrundeliegenden Mechanismen dieses Phänomens, das als "Kostimulationsblockade-resistente Transplantatabstoßung" bezeichnet wurde, sind derzeit nicht bekannt. Wie oben erläutert, lässt sich der Proliferationsdefekt CD28-defizienter T-Zellen sowie ihre Unfähigkeit zur Zytokinproduktion *in vitro* durch die exogene Zugabe von Zytokinen wie IL-2 aufheben. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass möglicherweise *in vivo* durch andere Zellpopulationen Zytokine produziert werden, die den Kostimulationsdefekt der T-Zellen überwinden können.

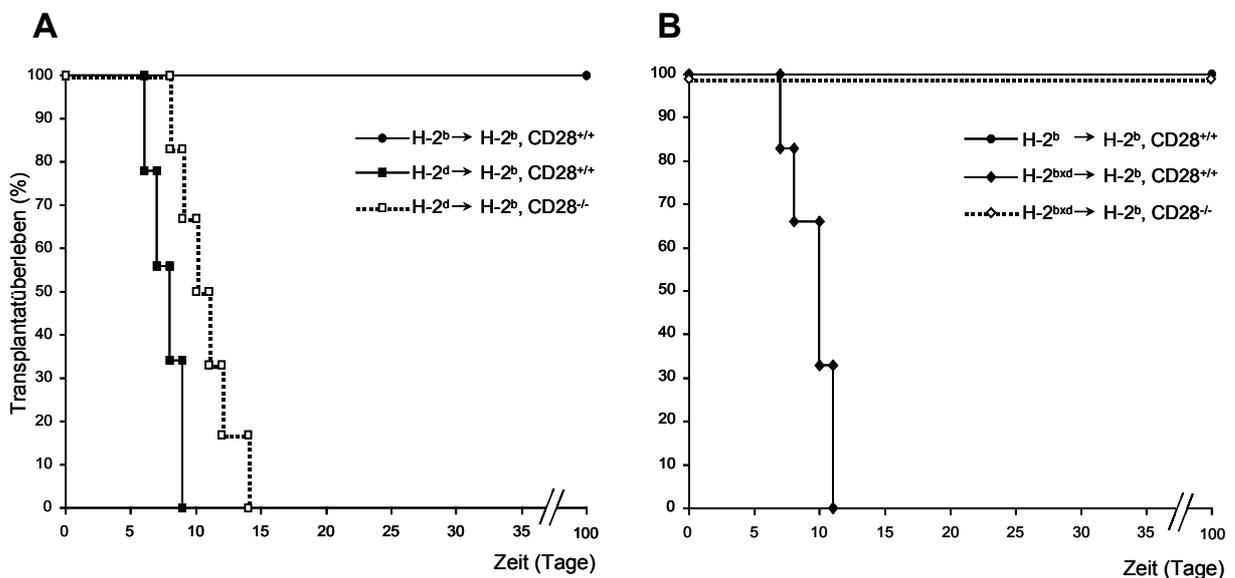


Abbildung 2.1: Abstoßung allogener, aber Akzeptanz semiallogener Herztransplantate in CD28-defizienten Empfängern.

Allogene Herzen werden durch CD28-defiziente im Vergleich zu Wildtyp- Empfängern nur gering verzögert abgestoßen. Semiallogene Transplantate dagegen überleben in CD28-defizienten Empfängern dauerhaft (Maier, 1998).

Eine faszinierende Beobachtung in bezug auf die Fragestellung der Kostimulationsblockade-resistenten Transplantatabstoßung ist, dass CD28-defiziente Mäuse zwar voll allogene Herztransplantate nur gering verzögert abstoßen, aber haploidentische (semiallogene) Transplantate langfristig akzeptieren (Abbildung 2.1B). Semiallogene Transplantate weisen auf der Zelloberfläche neben einer reduzierten Menge von Fremd-MHC zusätzlich auch "Selbst"-MHC-Moleküle auf. Wie in Kapitel 1 erläutert, ist das Fehlen von Selbst-MHC-I ein Signal für die Aktivierung von einer Komponente des angeborenen Immunsystems, den natürlichen Killerzellen. Natürliche Killerzellen sind damit potentielle Kandidaten für eine Zellpopulation, die T-Zellen eine Art von Hilfe, z.B. durch die Produktion von Zytokinen, liefern könnte. Eine Rolle von natürlichen Killerzellen ist bisher zwar in der Knochenmarktransplantation, nicht aber in der Abstoßung von soliden Organtransplantaten bekannt (zur Übersicht siehe Yu et al., 1992). Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Transplantatabstoßung in Abwesenheit von Kostimulation auseinander und untersucht eine mögliche Rolle von Zellen mit MHC-Klasse-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren.

Die bearbeiteten Fragestellungen sind dabei im einzelnen:

- 1.) Welche Zellpopulation infiltrieren allogene und semiallogene Herztransplantate in CD28-defizienten und Wildtyp-Empfängern?
- 2.) Lässt sich eine Infiltration von natürlichen Killerzellen und NK-T-Zellen in allogene Herztransplantate nachweisen? Welchen Einfluss haben CD28-Defizienz des Empfängers und Vorhandensein von Selbst-MHC-Molekülen auf den Transplantatzellen auf die Infiltration von natürlichen Killerzellen und NK-T-Zellen?
- 3.) Welchen Einfluss haben Abwesenheit des Kostimulationsmoleküls CD28 im Empfänger und Anwesenheit von Selbst-MHC-Molekülen auf dem Transplantat auf die Zytokin-Produktion in murinen Herztransplantaten?
- 4.) Lässt sich die Abstoßung von allogenen Herztransplantaten in CD28-defizienten Empfängern durch spezifische Depletion von NK1.1 exprimierenden Zellen verhindern oder verzögern?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 BEZUGSQUELLENNACHWEIS

3.1.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit Inzucht-Mäusen im Alter zwischen 8 und 16 Wochen durchgeführt. Als Transplantatempfänger wurden Mäuse mit dem MHC-Typ H-2^b verwendet, als Spender weibliche Mäuse mit den MHC-Typen H-2^d (BALB/c), H-2^{bxd} (CB6) und H-2^b (C57BL/6). Zur Untersuchung der Transplantatabstoßung in Abwesenheit des Kostimulationsmoleküls CD28 wurden als Empfänger CD28-defiziente Mäuse des MHC-Typs H-2^b verwendet. Dies waren für einige Histologien und die Zytokin-Messungen Tiere mit gemischtem genetischen Hintergrund aus C57BL/6 und Sv129J (beide H-2^b); für die Analyse isolierter Lymphozyten und die Transplantationen bei *in vivo* Depletion natürlicher Killerzellen wurden auf C57BL/6 rückgekreuzte CD28-defiziente Mäuse verwendet (B6.129S2-Cd28^{tm1MAK}, N12). Die zunächst mit den CD28-defizienten Mäusen gemischten Hintergrunds etablierten Abstoßungskinetiken wurden nachfolgend durch Transplantation in mindestens zwei B6.129S2-Cd28^{tm1MAK} Mäuse bestätigt. Als Wildtyp-Kontrollen dienten C57BL/6-Mäuse. Zur Etablierung der Färbung natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und NK-T-Zellen wurden Zellen aus C57BL/6 und BALB/c-Mäusen eingesetzt.

C57BL/6 und BALB/c-Mäuse wurden vom Institut für Versuchstierzüchtung Charles River, Hannover, CB6-Mäuse von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, und auf C57BL/6 rückgekreuzte CD28-defiziente Mäuse von Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine (USA) bezogen. Alle diese Mäuse sowie CD28-defiziente Mäuse gemischten Hintergrunds wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München unter SPF-Bedingungen (Spezifisch Pathogen-frei) gehalten bzw. gezüchtet.

Tabelle 3.1: MHC-Genotypen verwendeter Mausstämme

Mausstamm	MHC-Typ
C57BL/6	H-2 ^b
BALB/c	H-2 ^d
CB6	H-2 ^{bxd}
CD28 ^{-/-} , gemischter Hintergrund C57BL/6-Sv129J	H-2 ^b
B6.129S2-Cd28 ^{tm1MAK}	H-2 ^b

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Acrylamid 40%	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA
AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol)	Sigma, Taufkirchen
Agarose	GibcoBRL, Eggenstein
Ammoniumpersulfat	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Bis-Acrylamid 2%	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin, RIA Qualität)	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC (Diphenylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide	Boehringer, Mannheim
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Eosin Y	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Guanidiniumthiocyanat	Fluka, Ulm
Hämatoxylin, Pulver	Aldrich, Steinheim
Harnstoff (Urea)	GibcoBRL, Eggenstein
HEPES 1M	Seromed, Berlin
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Seromed, Berlin
Marker 1kb DNS-Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Jung tissue freezing medium	Leica Instruments, Nussloch, Germany
Penicillin	Seromed, Berlin
Phenol Rotipuran ®	Roth, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen

Repel-Silane ®	Pharmacia Biotech
Salzsäure	Sigma, Taufkirchen
Streptomycin	Seromed, Berlin
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg

3.1.3 Radiochemikalien

α [³³P]-Uridin 5'-Triphosphat wurde von der Firma ICN Pharmaceuticals (Costa Mesa, USA) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit verwendet.

3.1.4 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
cDNS Synthese Kit	GibcoBRL, Eggenstein
DNS Taq-Polymerase	GibcoBRL, Eggenstein
ExtrAvidin®-Meerrettich-Peroxidase	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzym <i>EcoR</i> 1	Gibco BRL, Eggenstein
Collagenase Typ II (aus <i>Clostridium histolyticum</i>)	Sigma, Taufkirchen
DNase I aus Rinderpankreas	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

3.1.5 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien/ Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Filterpapier Whatman 3MM	Schultheiss, München
Parafilm M	American National Can TM , Chicago, USA
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden Falcon, New Jersey, USA Corning, New York, USA
Quiagen Plasmid Isolierungskit	Quiagen, Hilden
QUIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
RiboQuant TM Multi-Probe	
RNase Protection Assay System	BD PharMingen, San Diego, USA
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen

3.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Durchflußzytometer	FacsCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese von DNS und RNS	Agagel Maxi/Midi, Biometra, Göttingen
Geldokumentationssystem	Eagle EYE II, Stratagene, Heidelberg
Geltrockner	Gel Dryer Model 583, Biorad
Kühlzentrifugen	JA-21 Beckmann, Palo Alto, USA Rotoren JA-14, JA-20
Mikroskop	ID 03, Zeiss, Jena Leica DMBRE
Phospho-Imager	Storm 840, Molecular Dynamics, USA
Photometer	LKB Biochrom Ultrospec Plus, Pharmacia, Uppsala, Schweden
Spannungsquellen	Power Pack P25, Biometra, Göttingen PS 500 XT, HSI, San Francisco PS 9009 TC, Gibco BRL, Eggenstein
Sterilbank	HLB 2472, Heraeus, Hanau
Szintillations-Counter	Miaxi 4450, United Technologies Packard, Frankfurt
Tischzentrifugen	Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg Biofuge 15, Haereus, Hanau Biofuge 15 R, Haereus, Hana
Vakuum Evaporations-Zentrifuge	DNA Speed Vac DNA110, Savant
Vertikales Gelsystem für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Model S2001, Life Technologies
Zentrifugen	Megafuge 1,0, Heraeus, Hanau Rotor 2250 mit Mikrotiterschaukeln Omnifuge 2,0 RS, Haereus, Hanau

3.2 PRIMER UND KONTROLLFRAGMENTE

Folgende Primerpaare wurden für Untersuchungen der Zytokin mRNA Expression verwendet:

Primer		Sequenz
beta-Aktin	sense	ATG GAT GAC GAT ATC GCT
beta-Aktin	antisense	ATG AGG TAG TCT GTC AGG T
IL-2	sense	ACT TCA AGC TCC ACT TCA AGC
IL-2	antisense	GCT TTG ACA GAA GGC TAT CCA
TNF α	sense	GAC AAG CCT GTA GCC CAC GTC GTA G
TNF α	antisense	ACA CCC ATT CCC TTC ACA GAG CAA T
IFN γ	sense	GAA AGC CTA GAA AGT CTG AAT AAC T
IFN γ	antisense	ATC AGC AGC GAC TCC TTT TCC GCT T
LT α	sense	TCC GTG CTT GCT CTC CAG AG
LT α	antisense	ATG ACA CTG CTC GGC CGT CT
IL-10	sense	ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA
IL-10	antisense	CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A
IL-12p40	sense	CGT GCT CAT GGT TGG TGC AAA G
IL-12p40	antisense	GAA CAC ATG CCC ACT TGC TG
IL-15	sense	CAG AGG CCA ACT GGA TAG ATG
IL-15	antisense	TCA TGT GAT CCA AGT GGC TC

Alle aufgeführten Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) bezogen.

Die Kontrollfragmente für die semiquantitative PCR für β -Aktin, IL-2, TNF α , LT α , IL-10 und IL-12 als aufgereinigte DNS und für IFN γ als Plasmid wurden freundlicherweise von Dr. Hans Neubauer zur Verfügung gestellt.

3.3 ANTIKÖRPER UND ZWEITREAGENZIEN

Für die Immunhistochemie wurden Überstände der Hybridome GK1.5 (L3T4), 53-6.7 (Lyt-2) und M1/70 (CD11b) verwendet. Fluoreszenzgekoppelte oder biotinierte Antikörper für die durchflußzytometrischen Analysen wurden von der Firma BD Pharmingen (San Diego, USA) bezogen mit Ausnahme des Cy5 gekoppelten anti-CD3 ϵ Antikörpers, der freundlicherweise von Dr. Elisabeth Kremmer zur Verfügung gestellt wurde. Als Zweitreagenz für die Immunhistochemie diente Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Ratte-F $_c$ Antikörper, in der Durchflußzytometrie wurde ein PerCP-StreptAvidin-Konjugat (BD Pharmingen, San Diego, USA) eingesetzt. Für die freundliche Überlassung von NK1.1-mAK (Klon PK136) für die *in vivo* Depletion natürlicher Killerzellen bedanke ich mich bei Dr. Yolande Chvatcho (Serono Pharmazeutisches Forschungsinstitut, Genf, Schweiz).

Tabelle 3.2: Verwendete monoklonale Antikörper

Antikörper (Klon)	Spezies und Isotyp	Spezifität	Antigen exprimierende Zellen	Referenz
GK1.5	Ratte (Lewis) IgG _{2b} , κ	CD4 (L3T4)	T Helfer Zellen	Dialynas, Quan, et al., 1983
53-6.7	Ratte (LOU/Ws1/M) IgG _{2a} , κ	CD8a (Lyt-2)	T-Suppressor- / zytotoxische T-Zellen	Ledbetter & Herzenberg, 1979
DX5	Ratte IgM, κ	Antigen nicht bekannt	Mehrzahl der NK-Zellen und kleine Subpopulation von T-Zellen in allen bisher getesteten Mausstämmen	BD Pharmingen, unveröffentlichte Ergebnisse
PK136	Maus [(C3H x BALB/c)F1] IgG _{2a} , κ	NK1.1 (NKR-1C, Ly-55)	NK- und NK-T-Zellen ausgewählter Mausstämme (z.B. C57BL, aber nicht BALB/c und Sv129)	Koo & Peppard, 1984
17A2	Ratte IgG _{2b}	CD3 ϵ (ϵ Kette des CD3 Komplexes)	Thymozyten und reife T-Zellen	Miescher, Schreyer, et al., 1989
M1/70	Ratte (DA) IgG _{2b} , κ	α -Kette von Mac-1 (CD11b, CR3)	Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, NK-Zellen	Springer, Galfre, et al., 1979
H57-597	Armenischer Hamster IgG, Gruppe 2, λ	TZR β -Kette	$\alpha\beta$ TZR exprimierende T-Zellen und Thymozyten	Kubo, Born, et al., 1989

3.4 PUFFER UND MEDIEN

3.4.1 Stammlösungen und Puffer

Stammlösung oder Puffer		Zusammensetzung
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,4
10 x PBS	137 mM	NaCl
	27 mM	KCl
	809 mM	Na ₂ HPO ₄
	15 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,4
Chloroform:Isoamylalkohol (50:1)	98 %	Chloroform
	2 %	Isoamylalkohol
TE-Puffer	10 mM	Tris, pH 8,0
	1 mM	EDTA, pH 8,0
TAE Elektrophoresepuffer	40 mM	Tris, pH 8,0
	20 mM	Eisessig
	2 mM	EDTA
6 x Gel-Lade-Puffer	15 %	Ficoll Typ 400
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05 %	Xylencyanol
dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP
10 x PCR-Puffer	500 mM	KCl
	100 mM	Tris-HCl, pH 8,3
	15, 20, 25 mM	MgCl ₂
	0,1 %	Gelatine

10 x TBE-Puffer	0,89 M	Tris
	0,89 M	Borsäure
	2m M	EDTA
		pH 8,3
Percoll Stocklösung „100%“	90 ml	Percoll
	10 ml	10 x PBS
FACS „Waschpuffer“	2 %	FKS
	0,01 %	Na-Azid in PBS
FACS „Färbepuffer“	2 %	FKS
	0,01 %	Na-Azid
	100 mg/l	MgCl/CaCl ₂ in PBS
„Lysepuffer“ Lösung A	10,3 g	Tris Base
	300 ml	H ₂ O _{bidest}
	mit HCl 32 %	auf pH 7,2 einstellen
	ad 500 ml	H ₂ O _{bidest}
„Lysepuffer“ Lösung B	8,4 g	NH ₄ Cl
	1000 ml	H ₂ O _{bidest}
		Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:9 mischen

3.4.2 Medium für die Bakterienkultur

Zur Kultivierung von *E. coli* für die Aufreinigung des Kontrollfragments für IFN γ wurde durch Autoklavieren (121°C/2bar/20 Min.) sterilisiertes Luria-Bertani (LB) Vollmedium verwendet.

Medium	Zusammensetzung
LB	Caseinhydrolysat 10 g
	Hefeextrakt 5 g
	NaCl 5 g
	H ₂ O _{dest} ad 1 l
	pH = 7,2

Das Festmedium entsteht durch Zugabe von 12 g Agar pro Liter vor dem Autoklavieren. Die Anzucht der Bakterien erfolgte aerob bei 37°C. Flüssigkulturen wurden im Schüttelkolben inkubiert.

Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Kulturmedium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugefügt.

Die Gewinnung der Bakterien aus Flüssigmedium erfolgte durch Abzentrifugieren bei 4000 UpM.

3.4.3 Medium für die Isolierung mononukleärer Zellen

Zusammensetzung des Mediums für die Isolierung mononukleärer Zellen	
Grundmedium	Dulbeccos Eagle Medium
Zusätze	
FKS	10 %
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml
β-Merkaptoethanol	0,05 mM
HEPES	10 mM

3.5 HETEROTOPE HERZTRANSPLANTATION IN DER MAUS

Herzen wurden heterotop durch Anastomosierung von Aortenwurzel und Pulmonalarterie an die großen infrarenalen Gefäße in die Bauchhöhle transplantiert. Dies entspricht einem vaskularisierten, rein immunologischen Modell, da die Empfängermaus für die Aufrechterhaltung des Kreislaufs nicht auf die Funktion des transplantierten Herzens angewiesen ist. Durch die Anastomosierung des Truncus aorticus des Transplantats an die Aorta abdominalis des Empfängers und der Pulmonalarterie des Transplantats an die Vena cava des Empfängers kommt es zum retrograden Blutfluss im Truncus aorticus und zum direkten Einstrom des oxygenierten Bluts in die Koronargefäße. Von dort findet das Blut nach Passage des Sinus venosus, des rechten Vorhofs und des rechten Ventrikels schließlich wieder Anschluss an die Vena cava des Empfängers.

Alle operativen Eingriffe wurden in Äthernarkose durchgeführt. Hierfür wird die Maus für ca. 30 Sekunden in eine Ätherkammer gesetzt. Zur Erhaltung der Narkose atmet die Maus dann ein Äther-Luft-Gemisch aus einem 15 ml Falcon-Röhrchen, an dessen Boden äthergetränkte Kompressen eingebracht wurden. Die Narkosetiefe kann so über Veränderung der Entfernung des

Röhrchens zur Nasenspitze der Maus reguliert werden. Nach Beendigung des Eingriffs wird das Röhrchen entfernt, und die Maus erwacht nach durchschnittlich 5 Min. aus der Narkose. Die Kontrolle des Transplantat-Überlebens erfolgte durch Fingerpalpation sowie bei unklarem Befund durch diagnostische Laparoskopie. Für die Durchführung der Transplantationen bedanke ich mich bei N. Chambron, K. Gerauer, N. Hüser und S. Maier.

Die Tierversuche waren gemäß Tierschutzgesetz von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) unter dem Aktenzeichen 211-2531-42/95 zuvor genehmigt worden.

3.6 HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE

3.6.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Transplantate wurden am Tag 5 sowie in einzelnen Fällen am Tag 100 nach Transplantation entnommen, in spezielle Einbettplastikschälchen gelegt und mit O.C.T. Einbettmedium luftblasenfrei überschichtet. Anschließend wurden die so eingebetteten Herzen unverzüglich in 2-Methylbutan, das in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde, schockgefroren. Die Präparate können dann bei -80°C gelagert werden.

Mit Hilfe eines Kryostats wurde der so hergestellte Gefrierblock in $8\ \mu\text{m}$ dünne Scheibchen geschnitten, diese wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht.

3.6.2 Konventionelle Färbung mit Hämatoxylin/Eosin

Zur Darstellung des leukozytären Infiltrats und der Gewebestruktur des Myokards wurden die Transplantate mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Durch den basischen Farbstoff Hämatoxylin werden die Zellkerne blau, durch den sauren Farbstoff Eosin das Zytoplasma in einem roten Farbton angefärbt.

Lösungen:

Saures Hämalaun nach Mayer:

- 1g Hämatoxylin in 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen
- dann hinzugeben: 0,2g Natriumjodat
 50g Aluminiumkaliumsulfat
- gut schütteln
- weiter zugeben: 50g Chloralhydrat Die Lösung muss sich blauviolett verfärben.
 1g Zitronensäure Die Lösung verfärbt sich rötlich-violett.

Eosinlösung:

- 10g Eosin in 1000 ml H₂O_{bidest} lösen
- Filtrieren der Lösung
- Zum Färben die Lösung 10fach verdünnt einsetzen
Unmittelbar vor Gebrauch 2-3 Tropfen Eisessig zugeben

Durchführung:Fixierung in aufsteigender Alkoholreihe:

Die auf die Objektträger aufgebrachten Präparate werden in 70 %igem Ethanol, 96 %igem Ethanol und Ethanol absolut jeweils 4x eingetaucht und dann für 5 Min. in Ethanol absolut bei Raumtemperatur inkubiert.

Färbung:

Die so fixierten Schnitte werden zunächst 30 Min. in der Hämatoxylinlösung gefärbt, dann drei mal 5 Min. in PBS gewaschen, 10 Min. in der Eosinfärbelösung gefärbt und noch einmal für 1 Min. in PBS gewaschen. Die getrockneten Schnitte werden mit Glycerin-Gelatine luftblasenfrei überschichtet und darauf vorsichtig ein Deckblatt platziert.

3.6.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbetechnik erlaubt den chemischen Nachweis von Molekülen in Zellen und Geweben unter weitgehender Schonung der mikroanatomischen Verhältnisse und unter Erhaltung der meisten Protein-Quartär-Strukturen. In dieser Arbeit wurde die Immunhistochemie zur Untersuchung des zellulären Infiltrats in Herztransplantaten eingesetzt. Verwendet wurden monoklonale (Ratte-anti-Maus) Antikörper spezifisch für die Oberflächenantigene CD4, CD8, und Mac-1 α . Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Maus-anti-Ratte F(ab)₂-Fragment. Als Substrat dient 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC), das durch die Peroxidase in einen rötlich-braunen Farbstoff umgewandelt wird.

Zur Vermeidung unspezifischer Färbung werden die Gewebeschnitte mit Ziegen Serum zur Absättigung unspezifischer Immunglobulin-Bindungsstellen und mit H₂O₂ zur Zerstörung endogener Peroxidaseaktivität vorbehandelt („quenching“).

AEC-Lösung: 5 mg/ml AEC in N,N'-Dimethylformamid lösen

Die Lösung muss im Dunkeln aufbewahrt werden.

<u>Substratlösung, pH 5,2:</u>	15 ml	0,2 M Essigsäure
	35 ml	0,2 M Natriumacetat
	150 ml	H ₂ O _{bidest}
	10 ml	AEC-Lösung
	30 µl	30 % H ₂ O ₂

Die Substratlösung muss frisch, kurz vor Gebrauch hergestellt werden.

Antikörper:

Für die Immunhistochemie wurden Überstände der Hybridome L₃T₄ (αCD4), Lyt2 (αCD8) und M1/70 (αMac-1) unverdünnt eingesetzt. Zur Detektion wurde der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper 1:100 in PBS + 1 % BSA verdünnt.

Durchführung:

Fixierung:

Objektträger mit Präparat 10 Min. in eiskaltem Aceton fixieren und vollständig trocknen lassen.

Färbung:

- 20 Min. Blockierung und „quenching“ (1000 µl PBS + 50µl normales Ziegen Serum + 2 µl H₂O₂, von dieser Lösung ca. 100 µl auf jeden Schnitt geben)
- 1 Min. Waschen in PBS
- 20 Min. Inkubation mit dem Erst-Antikörper (ca. 100 µl/ Schnitt)
- Waschen in PBS 3 x 2 Min.
- 30 Min. Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper (ca. 100 µl/ Schnitt)
- Waschen in PBS 3 x 2 Min.
- 10 Min. Färben in frisch hergestellter Substratlösung
- 10 Min. Gegenfärben in Mayers Hämatoxylin 50% verdünnt mit H₂O_{bidest}
- 5 Min. Bläuen in PBS

Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Glycerin-Gelatine luftblasenfrei überschichtet und vorsichtig ein Deckglas aufgebracht. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte am Mikroskop beurteilt und fotografiert (Leica DMBRE Photomikroskop).

3.7 MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN

3.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

3.7.1.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung von DNS-Fragmenten. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Hierbei erfolgt im Agarosegel eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe, wobei die Migrationsgeschwindigkeit zum inversen Logarithmus des Molekulargewichtes direkt proportional ist. Zur Darstellung wird der Gelmischung Ethidiumbromid zugegeben, welches sich in doppelsträngige DNS einlagert und bei Bestrahlung mit UV-Licht (266 nm) fluoresziert. Das Bandenmuster kann dadurch fotografisch festgehalten und analysiert werden.

Herstellung der Gele:

- 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufkochen, bis eine klare homogene Lösung entsteht
- Nach Abkühlen auf Handwärme Ethidiumbromid (Endkonzentration 5 µg/ml) zugeben, dann in eine Gelwanne mit den gewünschten Kämmen gießen und auspolymerisieren lassen

Elektrophorese:

- Die Gelwanne mit dem erstarrten Gel in eine Elektrophorese-Apparatur einsetzen und mit TAE-Puffer überschichten
- DNS-Proben 1:5 mit Ladepuffer mischen und in die Geltaschen pipettieren
- Durchführen der Elektrophorese je nach Gelgröße bei 80-150 Volt

Detektion der DNS-Fragmente:

- Die mit Ethidiumbromid markierten Banden wurden mit Hilfe des Eagle EYE II Geldokumentationssystem sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten.
- Für die weitere Dokumentation und Auswertung mittels Computerprogrammen (Adobe PhotoshopTM und CorelDRAW) wurden die Daten zusätzlich digital gespeichert.

3.7.1.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Um größere Mengen DNS auftragen zu können, wurden zu präparativen Zwecken mehrere Taschen der Kämmen abgeklebt. Anschließend wurde die Gelelektrophorese wie unter 3.7.1.1 beschrieben durchgeführt. Die gewünschte Bande im Gel wurde unter langwelliger UV-Beleuchtung (325 nm) ausgeschnitten. Aus dem isolierten Gelstück wurde die DNS mittels eines QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach der Anleitung des Herstellers gewonnen.

3.7.1.3 Bestimmung von Fragmentgrößen

Durch einen internen Standard im Gel – d.h. DNS-Fragmente bekannter Größe und Konzentration – kann die Größe der analysierten DNS-Moleküle und gegebenenfalls auch deren Konzentration bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dafür zwei Standards verwendet, wobei der λ -Standard durch Restriktionsverdau von λ -Phagen DNS mit *Eco* RI und *Hind* III hergestellt wurde. Die 1 kb-Leiter wurde von der Firma GibcoBRL bezogen.

Fragmentgrößen:

1/ <i>Hind</i> III	23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125
λ / <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI (bp):	21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125
1 kb-Leiter (bp):	12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517/506, 396, 344, 298, 220, 154/134, 75

3.7.2 Isolierung von Plasmid-DNS

Zur Gewinnung der Plasmid-DNS wurde der Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen verwendet. Die DNS Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.7.3 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifische, palindromische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNS. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindung beider Stränge, wobei DNS-Moleküle mit definierten Enden entstehen. Bei der Klonierung der Kontrollfragmente waren an beiden Enden Schnittstellen für das Enzym *Eco* R1 entstanden, so dass dieses Enzym auch verwendet werden konnte, um das Kontrollfragment aus der Plasmid-DNS herauszutrennen. Für den Verdau wurden 2 Einheiten *Eco* R1 pro μ g Plasmid-DNS eingesetzt.

Allgemeiner Ansatz:	DNS-Lösung	x μ l
	10 x Reaktionspuffer	3 μ l
	<i>Eco</i> R1	2 Einheiten/ μ g DNS
	H ₂ O _{bidest}	ad 30 μ l

Die Menge des eingesetzten Enzyms sollte 10 % des Reaktionsvolumens nicht überschreiten, da zu hohe Glycerinmengen die Reaktion beeinträchtigen können.

3.7.4 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebe

Die Transplantate wurden am fünften postoperativen Tag aus den Versuchstieren unter sterilen Bedingungen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Isolierung der RNS wurde eine Methode angewandt, bei der die Zellen durch Homogenisierung und Verwendung von Detergenzien aufgeschlossen werden (Chomczynski and Sacchi, 1987). Detergenzien wie Guanidiniumthiozyanat und Natriumlaurylsarcosin zerstören zelluläre Strukturen und bewirken die Denaturierung von Proteinen. Die durch Zellyse freigesetzten RNasen werden durch Guanidiniumthiozyanat und β -Mercaptoethanol inaktiviert. Die Abtrennung der RNS von anderen Nukleinsäuren erfolgt durch saure Phenolextraktion.

Puffer und Lösungen:

Bei der Herstellung der Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit RNA muss darauf geachtet werden, dass jegliche Kontamination mit RNasen vermieden wird. Eine Möglichkeit zur Inaktivierung von RNasen ist die Behandlung von Lösungen mit DEPC. Die anschließende Inaktivierung von DEPC ist unbedingt notwendig, da es sonst durch Carboxymethylierungsreaktionen zur Modifizierung von Purin-Basen der RNS kommt.

DEPC-H₂O: 0,1 % DEPC in H₂O_{bidest}
 Lösung über Nacht rühren
 DEPC durch Autoklavieren inaktivieren

35 % Natriumlaurylsarcosin:
 Die Lösung wird mit DEPC-H₂O angesetzt

1 M Natriumcitrat, pH 0 7,5:
 Natriumcitrat in H₂O_{bidest} lösen, pH einstellen
 Lösung mit 0,1 % DEPC behandeln
 DEPC durch Autoklavieren inaktivieren

Guanidiniumthiocyanat (GSCN):
 25 g Guanidinthiocyanat
 0,25 g Natriumlaurylsarcosin (0,71 ml einer 35%igen Lösung)
 0,75 ml 1M Natriumcitrat, pH = 7,5
 0,35 ml β -Mercaptoethanol
 ad 50 ml DEPC-H₂O

2 M Natriumacetat, pH = 4,0:
 Nariumacetat in H₂O_{bidest} lösen
 pH mit Eisessig einstellen
 Lösung mit 0,1 % DEPC behandeln
 DEPC durch Autoklavieren inaktivieren

3 M Natriumacetat, pH = 5,0:
 Herstellung analog zu 2 M Natriumacetat, s.o.

1M Tris/HCl, pH = 9,5:

Tris in DEPC-H₂O lösen
 pH mit HCl einstellen (dabei den pH von entnommenen Aliquots messen,
 um die Lösung nicht mit RNasen zu kontaminieren)
 Lösung autoklavieren

Phenol/Chloroform Tris-gesättigt, pH = 9,5:

Phenol und 1 M Tris/HCl, pH = 9,5 1:1 mischen und 30 Min. rühren
 mehrere Stunden stehen lassen, bis sich die Phasen getrennt haben
 obere wässrige Phase verwerfen
 2 x Äquilibrierung wiederholen
 1 Volumen Chloroform zugeben
 kühl lagern

Durchführung:

- Gewebe aus flüssigem Stickstoff entnehmen und in ein 15 ml Schraubdeckelgefäß mit 3 ml kaltem GSCN geben
- Gewebe sofort mittels Ultraturrax homogenisieren
- Zentrifugieren (5 Min./2000 UpM), um feste Bestandteile abzutrennen
- Je 400 µl Überstand in ein ERG geben, 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat zugeben und sofort vortexen
- 1 Volumen Phenol H₂O-gesättigt zugeben und sofort vortexen
- 1/7 Volumen Chloroform zugeben und kräftig schütteln
- 15 Min. auf Eis inkubieren
- zentrifugieren (15 Min./ 13000 UpM/ 4°C)
- obere wässrige Phase in ein neues ERG überführen und mit 2,5 Volumen EtOH_{abs.} mindestens 1 h bei -20°C fällen
- pelletieren (15 Min./ 13000 UpM/ 4°C)
- Phenol-Chloroform-Extraktion:
 - Pellet in 400 µl DEPC-H₂O aufnehmen und lösen
 - 1 Volumen Phenol/Chloroform /Tris-gesättigt, pH 9,5) zugeben, 30 Sek. vortexen
 - zentrifugieren (1 Min./ 13000 UpM/ 4°C)
- Überstand mit 0,3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen EtOH_{abs.} mindestens 1 h bei -20°C fällen
- Pelletieren (15 Min./ 13000 UpM/ 4°C)
- Pellet mit 70 % Ethanol waschen und Ethanol quantitativ abnehmen
- Pellet in 100-200 µl DEPC-H₂O aufnehmen und 5 Min. bei 65°C lösen
- Bestimmung der RNS-Konzentration bei 260 nm im Photometer

3.7.5 RNase Protection-Assay

Die Methode des RNase Protection-Assays (Melton et al., 1984) bedient sich der Tatsache, dass einzelsträngige, nicht aber doppelsträngige RNS durch RNase verdaut wird. Der RNase Protection-Assay wurde mit dem RiboQuant™ Kit (Pharmingen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt: α [³³P]UTP-markierte „antisense“ Riboproben wurden durch *in vitro* Transkription mit T7 RNS Polymerase hergestellt. Die Proben wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und über Nacht mit 10 μ g Gesamt-RNS in Hybridisierungspuffer bei 56°C hybridisiert. Nach dem Abbau von nicht hybridisierter RNS mit RNase H wurden die geschützten Fragmente elektrophoretisch auf einem 5 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen. Quantifiziert wurden die Banden mit Hilfe eines Storm 840 Phosphoimagers (Molecular Dynamics, USA). Zur Auswertung wurde ImageQuant Software verwendet.

Herstellung des Polyacrylamidgels:

5 %ige Acrylamid-Lösung:

- 8,85 ml Acrylamid 40%
- 9,31 ml Bis-Acrylamid 2%
- 7,45 ml 10 x TBE
- 35,82 g Urea
- ad 74,5 ml H₂O_{bidest}

Bei 37°C im Wasserbad lösen und anschließend abkühlen lassen.

Unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugeben:

- 900 μ l Ammoniumpersulfat 10 %
- 110 μ l TEMED

Die Lösung wird gleichmäßig und luftblasenfrei in das vorbereitete Gelsystem gegossen und muss mindestens eine Stunde auspolymerisieren.

Elektrophorese:

- Die Gelplatten mit dem erstarrten Gel in das vertikale Elektrophoresesystem einsetzen
- Gelkammern mit 0,5 x TBE-Puffer füllen
- Geltaschen gründlich spülen
- Vorlauf: 45 Min. bei 40 Watt
- Geltaschen nochmals spülen und die in Ladepuffer gelösten Proben in die Geltaschen pipettieren
- Die Elektrophorese wurde zunächst für 10 Min. bei 25 Watt und für die übrige Zeit bei 50 Watt durchgeführt.

3.7.6 Semiquantitative RT-PCR

Als weitere Methode zur Analyse der Transkription von Zytokinen in Herztransplantaten wurde die semiquantitative RT-PCR verwendet. Diese Methode ist zwar verglichen mit dem RNase Protection-Assay schwieriger zu quantifizieren und arbeitsaufwendiger, hat aber den Vorteil, dass sie aufgrund der enthaltenen PCR-Amplifikation sensitiver ist als der RNase Protection-Assay und somit auch für Zytokine eingesetzt werden kann, deren Transkription nur auf einem sehr geringen Level stattfindet. Als Ausgangsmaterial wird die zur mRNA komplementäre cDNS (cDNS) verwendet. Das Prinzip der semiquantitativen PCR besteht darin, bestimmte Zytokin-DNS-Sequenzen verschiedener cDNS-Präparationen mit spezifischen Primerpaaren zu amplifizieren und deren Bandenintensität nach Gelelektrophorese miteinander zu vergleichen, um so Rückschlüsse auf die Menge an mRNA zu ziehen. Gleichzeitig wird als Standard für jede cDNS eine β -Aktin-PCR durchgeführt. β -Aktin ist eine konstitutiv exprimierte mRNA, die ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorkommt. Die β -Aktin Standardisierung dient der Überprüfung der cDNS-Menge und der Qualität der verschiedenen Präparationen. Die Primerpaare sollten in verschiedenen Exons liegen, so dass eine mögliche Kontamination durch chromosomale DNS durch das Auftreten einer größeren DNS-Bande offenbar wird. Zusätzlich sollten die Primerpaare so gewählt sein, dass sie in ungefähr gleicher Entfernung vom 3'-Ende des Poly-A-Endes der jeweiligen mRNA zu liegen kommen, um systematische Fehler durch ungleichmäßige Transkriptionseffizienz zu vermeiden.

3.7.6.1 cDNS-Synthese

Bei cDNS oder komplementärer DNS handelt es sich um eine Kopie der mRNA, die sich durch Umschreiben der RNA mit Hilfe des retroviralen Enzyms reverse Transkriptase herstellen lässt. Die Verwendung von Oligo(dT)12-18 Primern erlaubt spezifisch die reverse Transkription von mRNA, da diese Oligonukleotide an das Poly-A-Ende der mRNA binden. Zusätzlich wird ein Hexamer-Oligonukleotid-Gemisch als Primer eingesetzt. Im Reaktionsansatz befinden sich neben Primern und Desoxynukleotiden RNasin, ein RNase Inhibitor, und DTT, ein Reduktionsmittel, welches zur Stabilisierung des Enzyms zugegeben wird. Für die cDNS-Synthese wurde der First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma GibcoBRL verwendet.

Reaktionsansatz:

2 μ g RNA	8 μ l
Oligo(dT)12-18 Primer	1 μ l
Hexamer-Primer	1 μ l
Transkriptionspuffer	4 μ l
DTT	2 μ l
dNTP (200 μ M)	2 μ l
RNasin	0,5 μ l
Reverse Transkriptase	1 μ l

Durchführung:

- 2 µg RNS mit DEPC behandeltem H₂O_{bidest} ad 8 µl auffüllen
- Primer dazugeben, vortexen
- 10 Min. bei 70°C inkubieren und anschließend rasch auf Eis abkühlen
- Puffer, DTT, dNTPs RNasin und reverse Transkriptase dazu pipettieren
- 1 h bei 37°C inkubieren
- Inaktivieren der reversen Transkriptase (5 Min. bei 95°C)
- cDNS kann bei –20°C gelagert werden

3.7.6.2 *Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR* (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der Eigenschaft von DNS-Polymerasen, einzelsträngige DNS als Matrize für die Synthese eines Komplementärstrangs zu benutzen, um so zahlreiche Kopien einer spezifischen DNS-Sequenz zu produzieren. Als Ausgangsmaterial wird in der Regel doppelsträngige DNS verwendet. Nach Hitzedenaturierung hybridisieren spezifische Primer, die jeweils das 5'-Ende und das 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz flankieren, an die einzelsträngige DNS. Die Primerverlängerung erfolgt durch eine thermostabile DNS-Polymerase. Nach der Synthese des Komplementärstrangs führt die Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Primerverlängerung über mehrere Zyklen zur Anreicherung der gewünschten DNS-Sequenz.

Die verschiedenen cDNS Präparationen wurden in einer 96-well ELISA-Platte über zwölf Verdünnungsstufen jeweils 1:2 seriell mit H₂O_{bidest} verdünnt, so dass Verdünnungen von 1:2 (in der ersten Spalte) bis 1:4096 (in der zwölften Spalte) vorlagen. Diese Platte wurde mit Parafilm verschlossen bei –20°C gelagert. Für die Durchführung der PCR wurden nach dem Auftauen jeweils 10 µl der Verdünnungsstufen in eine 96 Thermowell Platte pipettiert.

Lösungen und Puffer:

Primer: 100 µM

dNTP-Mix: 1 mM

10 x PCR-Puffer wird mit H₂O_{bidest} hergestellt und in Aliquots bei –20°C gelagert.

Reaktionsansatz:

cDNS	10 µl	der entsprechenden Verdünnung
Primer 1	1 µl	
Primer 2	1 µl	
10 x PCR Puffer	5 µl	
dNTP-Mix	10 µl	
Taq-Polymerase (5U/µl)	1 µl	
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl	

Durchführung:

- Reaktionsansatz auf Eis in eine 96-well-Platte geben und durch Pipettieren sorgfältig mischen
- Vorsichtig mit 50 µl Mineralöl beschichten, um Konzentrationsveränderungen durch Verdampfen des Ansatzes während der Reaktion zu vermeiden
- Durchführung der Reaktionszyklen:
Zum Teil mussten die PCR-Reaktionsbedingungen zunächst durch Austesten verschiedener Reaktionspuffer, Primerhybridisierungszeiten und –temperaturen optimiert werden. Die meisten PCRs wurden jedoch unter folgenden Standard-Bedingungen durchgeführt:

Funktion	Dauer	Temperatur
DNS-Denaturierung	5 Min.	95°C
DNS-Denaturierung	1 Min.	95°C
Primerhybridisierung	30 Sek.	61°C
Primerverlängerung	1 Min. 30 Sek.	72°C



Nach Beendigung der PCR wurden je 20 µl des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid detektiert. Eine Bande zeigte das Vorhandensein der Zytokin mRNA an. Der Vergleich der Titrationsstufen verschiedener cDNS, die gerade noch ein sichtbares DNS-Amplifikat ergaben, ermöglichte relative Aussagen über die Zytokin mRNA Mengen.

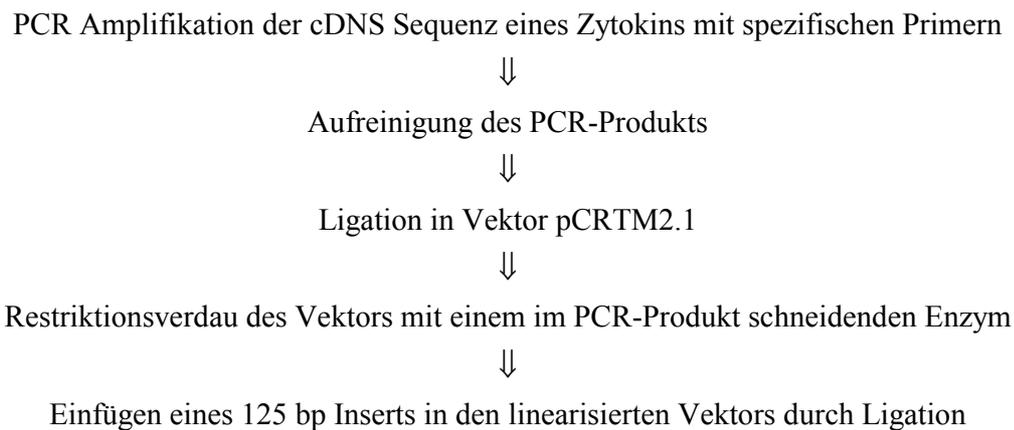
3.7.6.3 Kompetitive semiquantitative RT-PCR

Diese Methode stellt eine Erweiterung der semiquantitativen PCR dar und wird im wesentlichen wie diese durchgeführt. Zusätzlich wird dem PCR-Reaktionsansatz eine Kompetitor-DNS mit bekannter Konzentration zugegeben. Dieses sogenannte Kontrollfragment konkurriert mit der cDNS um die Primer im Reaktionsansatz. In der kompetitiven PCR werden diejenigen Titerstufen

verschiedener cDNS bestimmt, bei denen die Bandenintensität der PCR-Produkte von cDNA und Kontrollfragment annähernd gleich sind.

Kontrollfragmente sind DNS-Stränge, die in ihrer Sequenz der zu untersuchenden cDNA entsprechen, in die aber zusätzlich ein 125 bp großes Fragment inseriert wurde. Der 125 bp Größenunterschied zwischen dem Amplifikat des Kontrollfragment und dem der cDNS erlaubt eine gute Auftrennung im Agarosegel und erleichtert gleichzeitig durch seine räumliche Nähe zum Amplifikat auf dem Gel den Vergleich der Bandenintensitäten.

Die Klonierung von Kontrollfragmenten basiert auf folgendem Schema:



Die semiquantitative PCR war im Labor bereits etabliert, und die verwendeten Kontrollfragmente wurden freundlicherweise von Dr. Hans Neubauer zur Verfügung gestellt. Das Kontrollfragment für IFN γ wurde im Rahmen dieser Arbeit aus dem von Dr. Hans Neubauer hergestellten Plasmid aufgereinigt.

Zugabe einer zu hohen Menge an Kontrollfragment erniedrigt die Sensitivität der Detektion, bei einer zu geringen Menge sind jedoch alle Banden des Kontrollfragments schwächer als die des Amplifikats der cDNA, und somit ist die semiquantitative Analyse nicht möglich. Vor der Durchführung der Zytokin-Analysen wurde daher zunächst die optimale einzusetzende Menge an Kontrollfragment bestimmt.

3.8 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.8.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Milz und Blut

Die Organe wurden nach der Entnahme in PBS mit 2 % FKS auf Eis aufbewahrt. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Milz durch ein Sieb passiert und anschließend zweimal mit FACS Waschpuffer (PBS, 2 % FKS, 0,01 % Na-Azid) gewaschen. Peripheres Blut wurde in einer heparinisierten Spritze oder Pipettenspitze abgenommen, in PBS mit 1 mM EDTA gegeben und anschließend ebenfalls zweimal mit PBS, 2 % FKS und 0,01 % Na-Azid gewaschen.

3.8.2 Erythrozyten-Lyse

Zur Lyse roter Blutkörperchen wurden Milz- bzw. periphere Blutzellen nach Pelletieren ca. 5 Min. bei RT in 4 ml hypotoner NH_4Cl -Lösung (Lysepuffer) inkubiert und die Lyse durch Zugabe von 6 ml kaltem FACS Waschpuffer gestoppt.

3.8.3 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Herztransplantaten durch Kollagenase-Verdau

Vor der Entnahme der Herztransplantate (Tag 5) wurden diese intravital in Äthernarkose mit physiologischer NaCl-Lösung gespült. Durch die Spülung bei erhaltener Pumpfunktion des Herzens wird erreicht, dass auch das Blut aus den kleinen Kapillargefäßen zum größten Teil entfernt und so eine Kontamination der isolierten mononukleären Zellen aus dem Infiltrat mit Leukozyten aus peripherem Blut minimiert wird. Aufgrund der Perfusionsverhältnisse im Transplantat (siehe 3.5) kommt es regelmäßig zur Thrombosierung des linken Vorhofs. Um die den Thrombus organisierenden Leukozyten von der Analyse auszuschließen, wurden für die Isolierung infiltrierender mononukleärer Zellen nur die Ventrikel verwendet. Diese wurden zunächst manuell in kleine Stücke zerteilt und anschließend mit Hilfe von Kollagenase verdaut (1 h, 37°C im Über-Kopf-Schüttler).

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Verdauung

Kollagenase	2,5 mg/ml
Typ II	(\cong 4 U/ml)
DNase	0,1 mg/ml
Medium	ad 5ml

Um nach dem Verdau noch locker zusammenhängendes Gewebe mechanisch zu trennen, wurde das verdaute Gewebe vorsichtig durch ein Metallsieb passiert. Mikroskopische Kontrolle bestätigte, dass auf diese Weise eine Einzelzellsuspension erzielt wurde. Nach einmaligem Waschen mit frischem Medium wurden die Zellen in 4 ml Medium resuspendiert.

3.8.4 Isolierung mononukleärer Zellen durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation

Zur Abtrennung mononukleärer Zellen von den ebenfalls in der so erstellten Zellsuspension enthaltenen Kardiomyozyten, Bindegewebs- und Endothelzellen wurde die Methode der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Percoll-Gradienten eignen sich sehr gut zur Auftrennung von Zellen, Viren und anderen subzellulären Partikeln. Bei Zentrifugation einer Suspension von Partikeln ist die Sedimentationsgeschwindigkeit proportional zur einwirkenden Kraft und abhängig von den physikalischen Eigenschaften der Lösung. Bei konstanter Zentrifugalkraft und Viskosität der Lösung ist die Sedimentationsgeschwindigkeit proportional zur Größe der Partikel und der Differenz zwischen der Dichte der Partikel und der Dichte des umgebenden Mediums.

$$v = \frac{d^2 (\rho_p - \rho_l)}{18\eta} \times g$$

v = Sedimentationsgeschwindigkeit
d = Durchmesser der Partikel
 ρ_p = Dichte der Partikel
 ρ_l = Dichte des umgebenden Mediums
 η = Viskosität des Mediums
g = Zentrifugalkraft

Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist daher null, wenn die Partikeldichte gleich der Dichte des umgebenden Mediums ist; d.h. ein Partikel, das den seiner eigenen Dichte äquivalenten Bereich in einem Gradienten erreicht hat, bewegt sich nicht weiter fort.

Bei einem diskontinuierlichen Gradienten gelangen Partikel mit einer Dichte, die zwischen den Dichten zweier eingesetzter Percoll-Konzentrationen liegt, in die entsprechende Interphase. Zur Isolierung mononukleärer Leukozyten wurde ein einstufiger diskontinuierlicher Percoll-Gradient mit einem relativ großen Dichtesprung (67 %iger und 36 %iger Percoll) verwendet, um die unterschiedlichen Populationen der mononukleären Leukozyten in einer Schicht zu vereinen. Nach Zentrifugation (20 Min. 1800 UpM bei RT, Akzeleration 9, Dezeleration 2) fanden sich die viablen mononukleären Leukozyten in der 67 %/35 % Interphase. Diese Schicht wurde geerntet und die Zellen nach zweimaligem Waschen mit frischem Medium für die durchflußzytometrische Immunfluoreszenzanalyse eingesetzt. Durch Auszählen eines Aliquots in der Neubauer-Zählkammer wurde die Gesamtzahl isolierter mononukleärer Leukozyten pro Transplantat bestimmt und die Viabilität der Zellen durch Eosin-Exklusion überprüft.

Die Isolierung und Analyse mononukleärer Zellen aus den Transplantaten wurden in Zusammenarbeit mit Nicole Chambron durchgeführt.

<u>Lösungen:</u>	Percoll 35%	35 ml Percoll Stocklösung „100 %“ 65 ml Medium
	Percoll 67%	67 ml Percoll Stocklösung „100 %“ 33 ml 1 x PBS

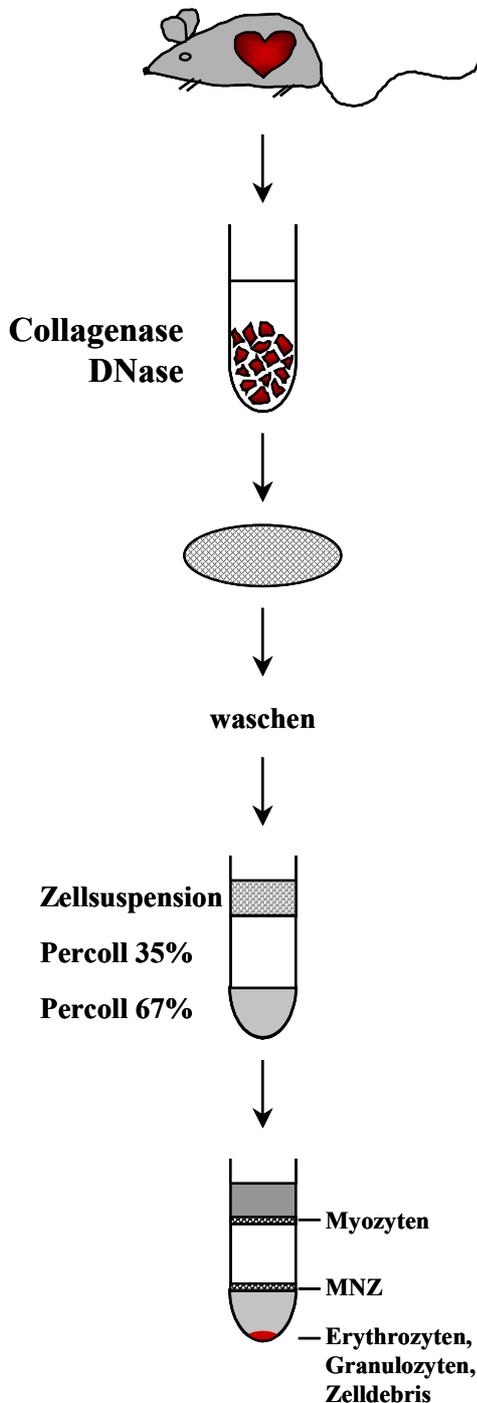


Abbildung 1.1: Isolierung mononukleärer Leukozyten aus Herztransplantaten.

Schematische Darstellung der Aufreinigung von mononukleären Zellen aus Herztransplantaten.

Durchführung:

- Je Transplantat 2 Rundboden-Plastikgefäße mit 2 ml FKS spülen
- Percoll auf RT bringen und vorsichtig in die Plastikgefäße schichten
- Je 2 ml Zellsuspension darüber schichten (Zellsuspension je eines Transplantats wird auf zwei Gradienten verteilt)
- Zentrifugieren 20 Min. 1800 UpM bei RT, ohne Bremse (acc. 9, dec. 2)
- Schichten mit Pasteurpipette vorsichtig absaugen und in Spitzboden-Plastikgefäße geben. Aus den Interphasen Medium/ Percoll 35 % requirierte Zellen werden verworfen, die aus den Interphasen Percoll 67 %/ 35 % requirierten mononukleären Leukozyten eines Transplantats wieder vereint.
- Auffüllen auf 10 ml mit frischem Medium, zentrifugieren 10 Min./ 1500 UpM/ 4°C
- Pellet mit 10 ml frischem Medium resuspendieren, zentrifugieren 6 Min./ 1200 UpM/ 4°C
- Pellet in gewünschtem Volumen FACS Färbepuffer aufnehmen
- 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Eosinlösung mischen und für die Auszählung in der Neubauer-Zählkammer einsetzen
(Zellen/ml = Zellzahl in 16 kleinen Quadraten x 10⁴ x 2)

3.9 IMMUNFLUORESZENZANALYSE

3.9.1 Durchflußzytometrie

Zum Nachweis der Expression von Zelloberflächenantigenen wurden die zu testenden gewaschenen Zellen geerntet und in FACS Färbepuffer aufgenommen. Anschließend wurden sie nach 5 Min. Vorinkubation mit 10 µl Fc-Block 20 Min. mit 30 µl der entsprechenden Verdünnung der monoklonalen Antikörper bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte gegebenenfalls die Inkubation mit einem Sekundärreagenz für 20 Minuten bei 4°C. Nach wiederum zweimaligem Waschen mit FACS Färbepuffer wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert. Die Analysen der Immunfluoreszenz wurden am FACScalibur Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt und mit der CellQuest Software (ebenfalls Beckton Dickinson) ausgewertet.

3.9.2 Mehrfarbenfluoreszenzanalyse

Die Kombination von geeigneten Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Antigene auf der Oberfläche einer Zelle. Voraussetzung sind Farbstoffe, die sich in ihren Emissionsspektren unterscheiden und deshalb getrennt voneinander gemessen werden können. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden FITC (Emissionsmaximum 530 nm), PE (585 nm), PerCP (682 nm) und Cy5 (674 nm) verwendet. Je nach untersuchten Antigenen wurden meistens FITC-, PE- und Cy5- direktmarkierte Antikörper eingesetzt. Bei einem vierten Antikörper handelt es sich in der Regel um einen biotinierten Antikörper mit Streptavidin-PerCP als Zweitreagenz.

Tabelle 3.4: Konjugation und Verdünnung der eingesetzten Antikörper

Antikörper-Konjugat	Verdünnung
Anti-CD4 FITC	1:200
Anti-CD8 Cy5	1:350
Anti-NK1.1 PE	1:200
Anti-DX5 FITC	1:100
Anti-CD3ε Cy5	1:100
Anti-TZRβ bio	1:100

3.10 *IN VIVO* DEPLETION VON NK1.1 POSITIVEN ZELLEN

Zur Depletion von natürlichen Killerzellen und NK-T-Zellen wurden Mäuse perioperativ mit monoklonalem anti-NK1.1-Antikörper (Klon PK136) behandelt. Injiziert wurden je 200 µg Antikörper in PBS intravenös zwei Tage vor und einen Tag nach Transplantation sowie intraperitoneal an den postoperativen Tagen 3, 5, 9, 13, 17 und 21.

Als Kontrolle wurden nach dem gleichen Schema 200 µg Maus IgG bis zur Abstoßung des Transplantats injiziert. Zur Kontrolle der Depletionseffizienz wurde den Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten Blut aus der Schwanzvene entnommen und mittels FACS-Analyse das Vorkommen von NK- und NK-T-Zellen im peripheren Blut untersucht.

4 ERGEBNISSE

4.1 ALLOGENE HERZTRANSPLANTATE IN CD28^{-/-} EMPFÄNGERN ZEIGEN EIN AGGRESSIVES LEUKOZYTÄRES INFILTRAT

Syngene und allogene Herztransplantate wurden am Tag 5 postoperativ aus CD28^{+/+} oder CD28^{-/-} Empfängern entnommen. Zur Charakterisierung des zellulären Infiltrats wurden Kryoschnitte mit monoklonalen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD4, CD8, B220 und CD11b (Mac-1 α) markiert. In allogenen Transplantaten zeigt sich unabhängig vom CD28-Genotyp des Empfängers eine ausgeprägte Infiltration mit CD8⁺ und Mac-1⁺ Zellen, während syngene Kontroll-Transplantate am Tag 5 kein wesentliches Infiltrat aufweisen. Weiterhin zeigen allogene Transplantate am Tag 5 sowohl in Wildtyp- als auch in CD28-defizienten Empfängern bereits eine deutliche Zerstörung der Myokardstruktur (Abbildung 4.1). In allen Transplantaten ließen sich kaum B220 positive Zellen nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Die deutliche Infiltration Mac-1 α positiver Zellen legt eine mögliche Rolle Mac-1 α exprimierender Zellen bei der Transplantatabstoßung nahe. Der Oberflächenmarker Mac-1 α entspricht dem Komplementrezeptor 3 und wird nicht nur von Makrophagen, sondern auch von Granulozyten und natürlichen Killerzellen exprimiert (Springer et al., 1979). Eine Differenzierung der in den Transplantaten nachgewiesenen Mac-1 α positiven Zellpopulation könnte daher weitere Aufschlüsse über die bei der Transplantatabstoßung in Abwesenheit von CD28 beteiligten Zellpopulationen und Mechanismen geben.

4.2 CD28-DEFIZIENZ FÜHRT ZUR REDUKTION DER INFILTRATION VON CD4⁺ T-ZELLEN IN ALLOGENE HERZTRANSPLANTATE

Neben CD8⁺ und Mac-1 α ⁺ Zellen findet sich in allogenen Herztransplantaten in Wildtyp-Empfängern auch ein deutliches Infiltrat CD4 positiver Zellen. Bei Transplantation in CD28-defiziente Mäuse ist die Infiltration CD4⁺ Zellen drastisch reduziert (immunhistochemische Untersuchung, Daten nicht gezeigt).

Zur genaueren Charakterisierung der Mac-1 α positiven Zellpopulation und quantitativen Analyse der infiltrierenden Zellpopulationen wurden Transplantate am Tag 5 entnommen und mittels Kollagenase Typ II verdaut. Die so gewonnene Einzelzellsuspension wurde über einen Percoll-gradienten aufgetrennt und mononukleäre Leukozyten (MNZ) durchflußzytometrisch analysiert (Abbildung 4.2).

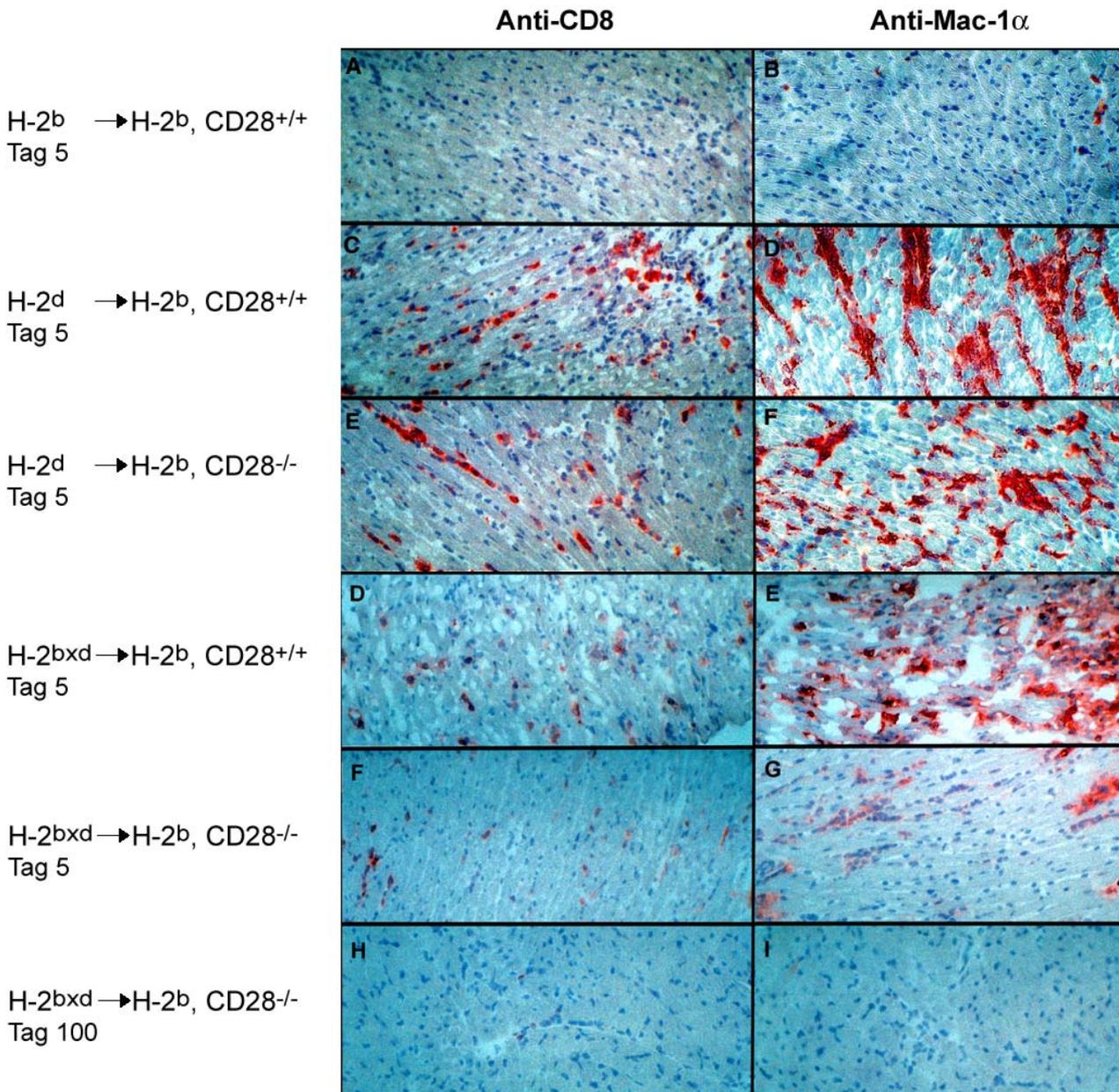


Abbildung 4.1: Immunhistochemische Färbungen von Herztransplantaten.

Kryoschnitte von an Tag 5 bzw. Tag 100 nach Transplantation entnommenen Herzen wurden mit anti-CD8 und anti-CD11b (Mac-1 α) inkubiert und gebundene Antikörper über einen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Im Gegensatz zu syngenen Transplantaten (A, B) werden allogene Transplantate unabhängig von der Anwesenheit von CD28 aggressiv von CD8⁺ und Mac-1 α ⁺ Zellen infiltriert (C-F). Auch in semiallogen in CD28^{+/+} Empfänger transplantierten Herzen findet sich eine deutliche Infiltration CD8⁺ und Mac-1 α ⁺ Zellen. Semiallogen in CD28-defiziente Empfänger transplantierte Herzen dagegen zeigen nur ein geringes (Tag 5) bzw. kein (Tag 100) Infiltrat CD8⁺ und Mac-1 α ⁺ Zellen und weisen am Tag 100 nach Transplantation noch eine intakte Myokardstruktur auf (F-I).

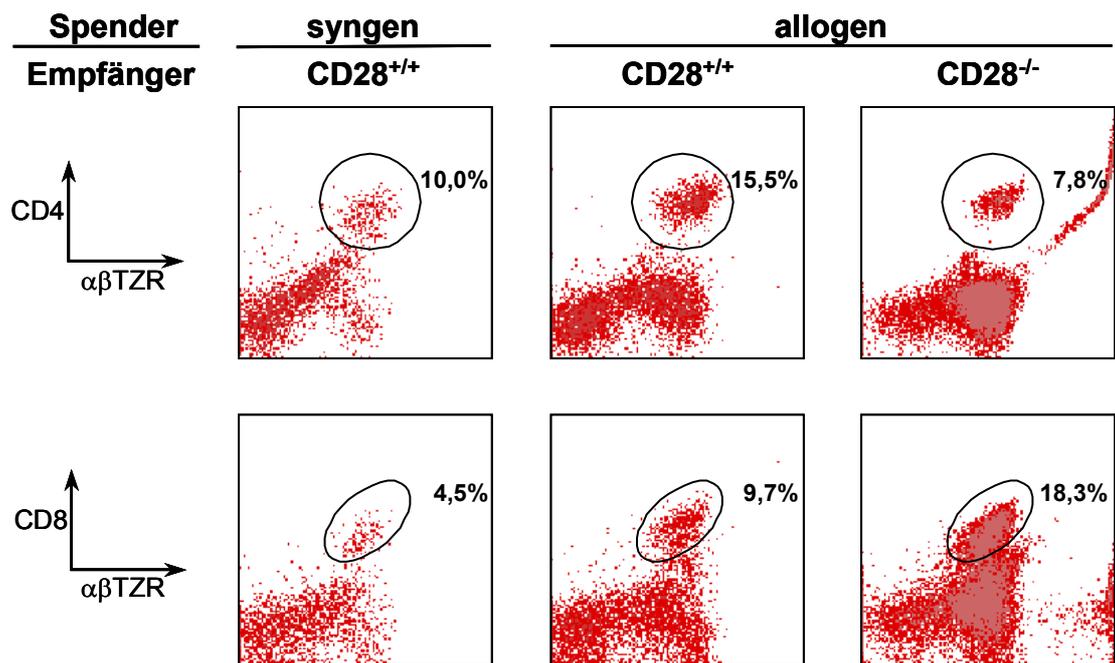


Abbildung 4.2: Durchflußzytometrische Analyse Transplantat infiltrierender Zellen.

Aus an Tag 5 nach Transplantation explantierten Herzen wurden mononukleäre Leukozyten isoliert und mit FITC-markierten anti-CD4, PE-markiertem anti-CD8 und biotiniertem anti- $\alpha\beta$ -TZR sowie Streptavidin-PerCP als Zweitreakanz inkubiert. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative von 3-4 durchgeführten Analysen pro Gruppe als Zweifarben dot plot.

Durch quantitative Auswertung der Gesamtzahl isolierter infiltrierender Leukozyten pro Transplantat können aus den in der Durchflußzytometrie gewonnenen anteiligen Prozentzahlen die ungefähren Anzahlen infiltrierender Zellen einer bestimmten Population pro Transplantat errechnet werden. Aus syngenem Transplantat ließen sich insgesamt deutlich weniger ($< 1 \times 10^6$ MNZ pro Transplantat) mononukleäre Zellen isolieren als aus allogenen Transplantaten (2 bis 3×10^6 MNZ pro Transplantat, Abbildung 4.3 A). Die wenigen aus syngenem Transplantat isolierten Zellen setzen sich vermutlich zusammen aus Zellen aus einem geringen unspezifischen subepikardialen Infiltrat, welches auch in den Histologien beobachtet wurde und sich durch das Operationstrauma erklären lässt, sowie aus „Bystander“-Leukozyten aus dem peripheren Blut. Aus allogenen in CD28^{-/-} Empfänger transplantierten an Tag 5 entnommenen Herzen konnten im Vergleich zu Wildtyp-Empfängern insgesamt weniger mononukleäre Zellen isoliert werden. In der durchflußzytometrischen Untersuchung zeigte sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunhistochemie, dass diese Reduktion hauptsächlich durch eine verminderte Infiltration durch CD4⁺TZR⁺ Zellen zustande kommt (Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3 A). Die Anzahl CD8⁺TZR⁺ Zellen bei CD28^{-/-} Empfängern hingegen unterscheidet sich nicht signifikant von den bei Wildtyp-Empfängern gefundenen Zellzahlen. Die Reduktion CD4⁺, nicht aber CD8⁺ T-Zellen zeigt sich eindrucksvoll in einer Umkehr der CD4/CD8 Ratio von $1,5 \pm 0,2$ in Wildtyp- auf $0,3 \pm 0,1$ in CD28-defizienten Empfängern.

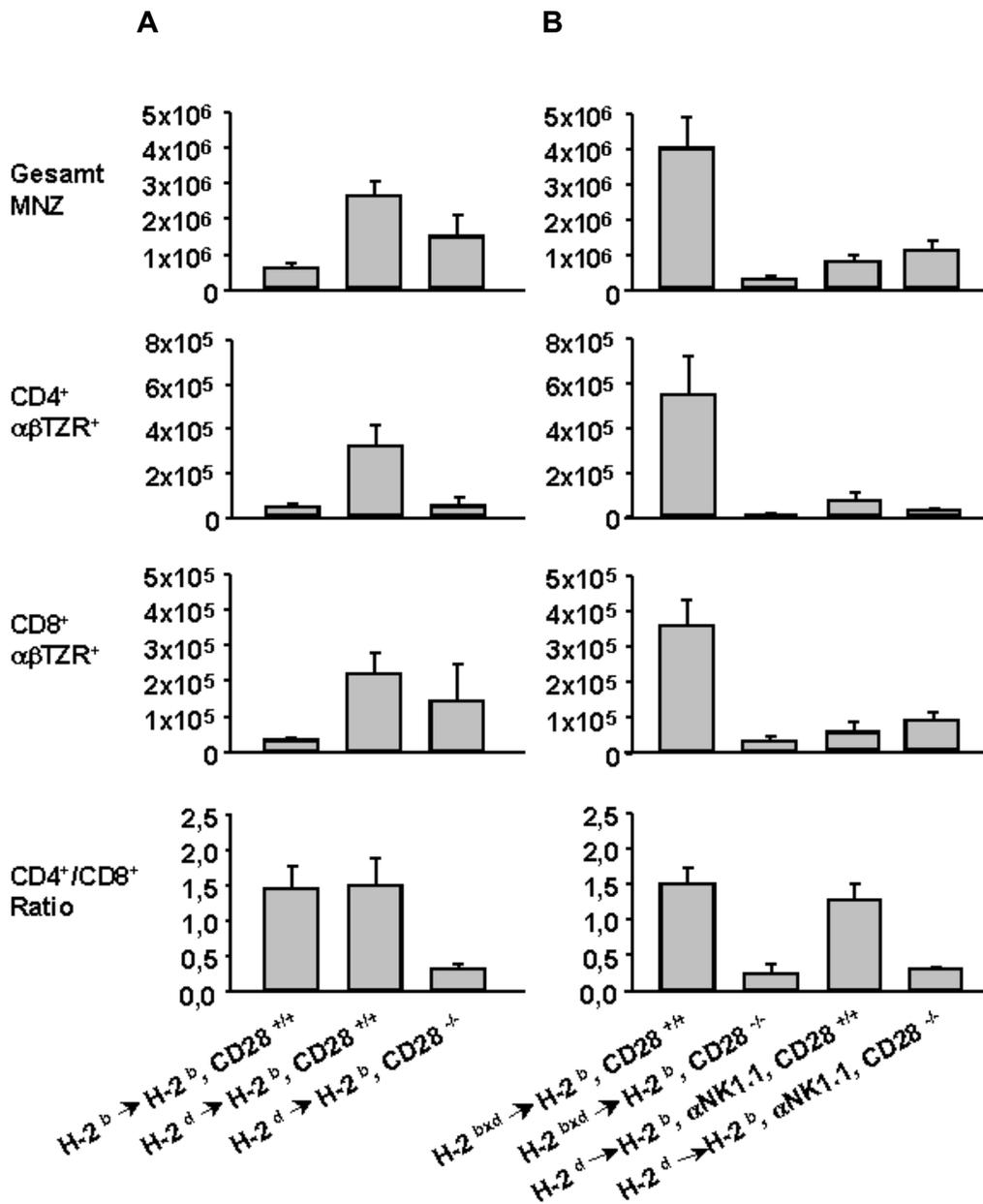


Abbildung 4.3: Quantitative Auswertung unterschiedlicher Transplantat infiltrierender Leukozyten-Populationen.

(A) Syngene Kontrolle, allogene Transplantation in Wildtyp- und CD28-defiziente Empfänger.

(B) Semiallogene Transplantation in Wildtyp- und CD28-defiziente Empfänger sowie allogene Transplantation unter Depletion NK1.1 positiver Zellen

Die Gesamtzellzahl der verschiedenen Transplantate wurde in der Zählkammer bestimmt und die absoluten Anzahlen spezifischer Zellpopulationen aus den Gesamtzellzahlen und den in der Durchflußzytometrie ermittelten relativen Anteilen der Populationen (s. Abbildung 4.2) errechnet.

(A) Die Reduktion der Gesamtzahl infiltrierender Leukozyten in allogenen in CD28-defiziente Empfänger transplantierten Herzen im Vergleich zu in Wildtyp-Empfänger transplantierten Herzen erklärt sich vornehmlich durch die Reduktion CD4⁺ T-Zellen auf ein der syngenen Transplantation vergleichbares Niveau. Entsprechend ist die CD4/CD8 Ratio bei CD28-defizienten Empfängern deutlich zugunsten der CD8⁺ Zellen verschoben.

(B) Semiallogene Transplantation in CD28-defiziente Empfänger führt zur Reduktion der Infiltration nicht nur der CD4⁺, sondern auch der CD8⁺ T-Zellen in Transplantate. Aus allogenen in CD28^{+/+} oder CD28^{-/-} Mäusen unter Depletion NK1.1 positiver Zellen transplantierten allogenen Herzen lassen sich ebenfalls weniger MNZ isolieren.

Das Kostimulationsmolekül CD28 scheint also eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung und / oder Proliferation von T-Helferzellen in der Transplantatabstoßung zu haben, während CD8⁺ Zellen *in vivo* deutlich weniger abhängig von einer Kostimulation durch CD28 sind.

4.3 NK- UND NK-T-ZELLEN INFILTRIEREN ALLOGENE HERZTRANSPLANTATE

Durch Verwendung von Mehrfachfärbungen in der Durchflußzytometrie lässt sich die in der Immunhistochemie gesehene Mac-1 α ⁺ Zellpopulation auf die gleichzeitige Expression weiterer Marker untersuchen und so weiter aufschlüsseln. Um der Frage nachzugehen, ob sich innerhalb dieser Population auch natürliche Killerzellen befinden, wurden Vierfachfärbungen mit anti-Mac-1 α , anti-DX5, anti-NK1.1 und anti-CD3 durchgeführt. Abbildung 4.4 zeigt eine solche durchflußzytometrische Untersuchung der aus einem in die Wildtyp-Maus transplantierten allogenen Herzen isolierten mononukleären Zellen. Die Mac-1 α positive Zellpopulation setzt sich zusammen aus ca. 20 % NK1.1⁺DX5⁺Mac-1 α ⁺ NK-Zellen sowie ca. 80 % NK1.1⁻DX5⁻Mac-1 α ⁺ Zellen. Da die Isolationsbedingungen so gewählt wurden, dass Granulozyten durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt wurden, ist davon auszugehen, dass die letztere Population weitestgehend aus Makrophagen besteht. Die Mehrfarbenanalyse zeigt außerdem, dass Mac-1 α auf NK-Zellen im Vergleich zu Makrophagen niedriger exprimiert ist (Abbildung 4.4 B und C). Neben DX5/NK1.1⁺CD3⁻ NK-Zellen lässt sich auch eine Population von DX5/NK1.1⁻CD3⁺ NK-T-Zellen anfärben. Im Gegensatz zu natürlichen Killerzellen exprimieren NK-T-Zellen kein Mac-1 α (Abbildung 4.4 B-D).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten spezifischen Antikörper zur Identifizierung von NK- und NK-T-Zellen anti-DX5 und anti-NK1.1 färben ähnliche, aber nur teilweise überlappende Zellpopulationen an. Dabei ist der Anteil NK1.1 exprimierender Zellen innerhalb DX5⁺CD3⁻ (NK-) Zellen deutlich höher als innerhalb der DX5⁺CD3⁺ (NK-T-) Zellen (Abbildung 4.4 D).

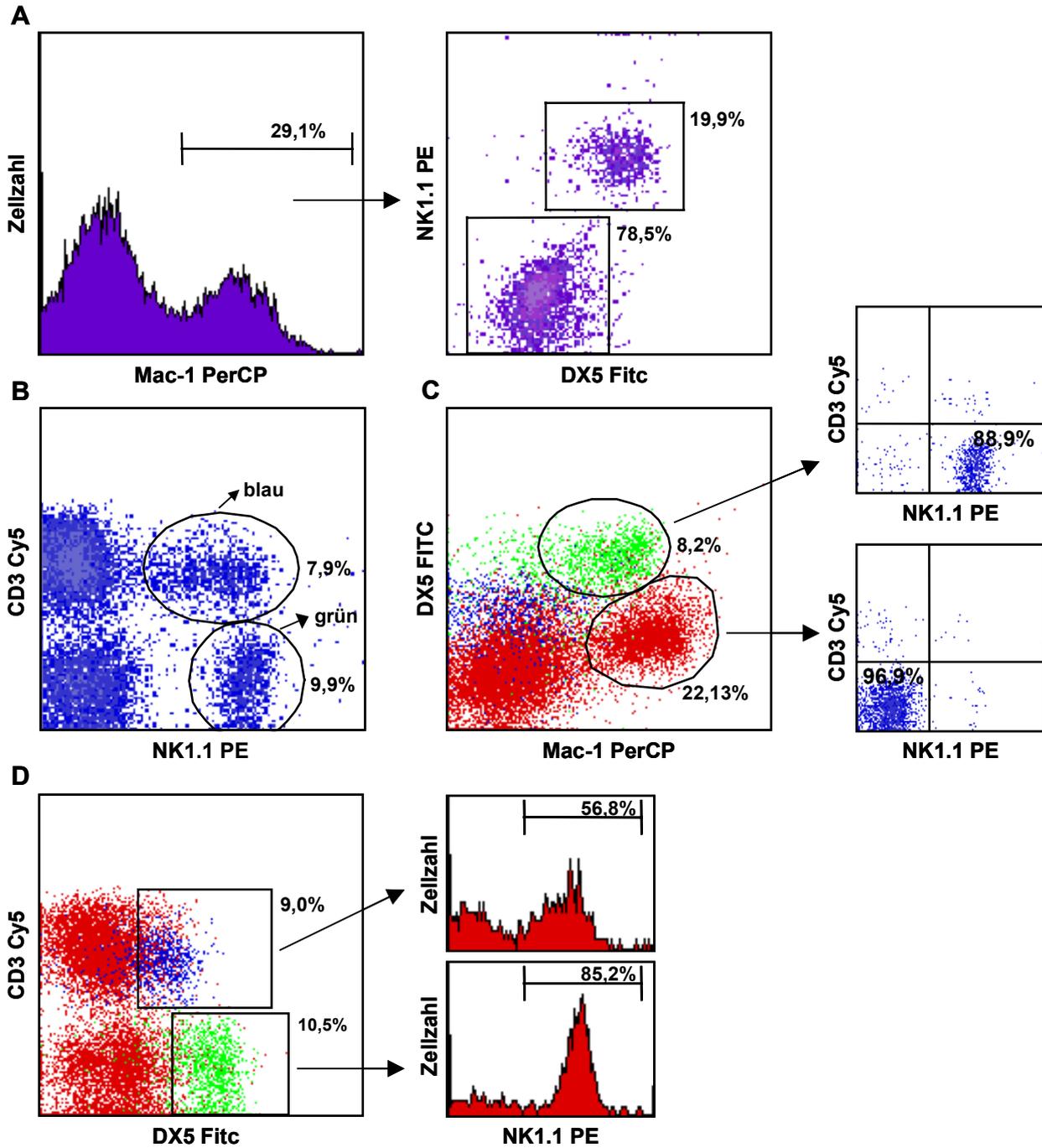


Abbildung 4.4: Zusammensetzung Mac-1 α und DX5 exprimierender Populationen in Transplantat infiltrierenden Leukozyten (H-2^d \rightarrow H-2^b, WT).

Aus allogenen in Wildtyp-Empfänger transplantierten Herzen (Tag 5) isolierte mononukleäre Leukozyten wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Mac-1 α , DX5, NK1.1 und CD3 gefärbt. Mac-1 α positive Zellen (A) setzen sich zusammen aus DX5⁺NK1.1⁺ (ca. 20 %) und DX5⁺NK1.1⁻ Zellen (ca. 80 %). NK1.1⁺CD3⁺ Zellen (B) sind in C und D in blauer Farbe, NK1.1⁺CD3⁻ Zellen in grün dargestellt. NK1.1⁺CD3⁻ NK-Zellen exprimieren geringere Level Mac-1 α als Mac-1 α ⁺NK1.1⁻ Makrophagen. NK1.1⁺CD3⁺ NK-T-Zellen sind Mac-1 α negativ. (B, C). Der Anteil NK1.1 exprimierender Zellen ist innerhalb DX5⁺CD3⁺ NK-T-Zellen geringer als innerhalb DX5⁺CD3⁻ NK-Zellen (D).

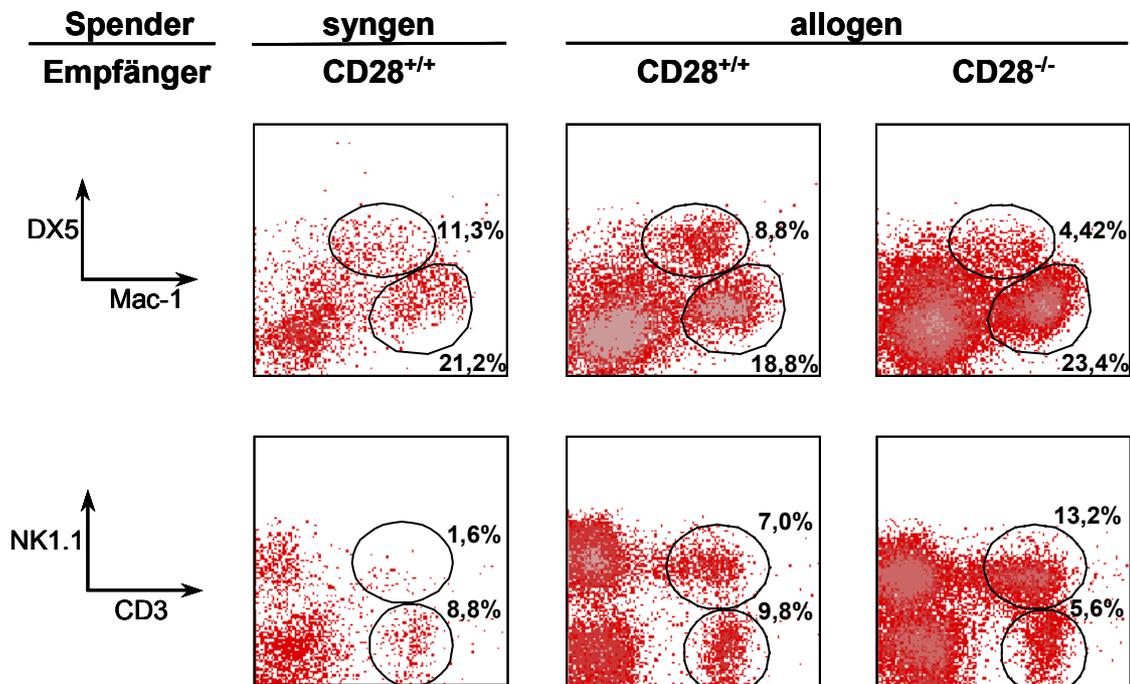


Abbildung 4.5: Makrophagen, NK- und NK-T-Zellen in Herztransplantaten.

Aus an Tag 5 nach Transplantation explantierten Herzen isolierte mononukleäre Leukozyten wurden mit FITC-gekoppeltem anti-DX5, PE-gekoppeltem anti-NK1.1, Cy5-gekoppeltem anti-CD3 und biotiniertem anti-Mac-1 α sowie Streptavidin-PerCP als Zweitreagenz inkubiert. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative von 3-4 durchgeführten Analysen pro Gruppe als Zweifarben dot plot.

Als wesentliche Populationen wandern NK-Zellen (6,5 – 12,9 % der isolierten MNZ) und NK-T-Zellen (4,2 - 11,8 % der isolierten MNZ) (Abbildung 4.5 und Daten nicht gezeigt) in allogene Herztransplantate ein. Bei der quantitativen Auswertung zeigt sich, dass die Anzahl der infiltrierenden natürlichen Killerzellen in den CD28-defizienten Empfängern im Vergleich zu Wildtyp-Empfängern tendenziell geringer ist, während hinsichtlich der Infiltration von DX5⁺CD3⁺ Zellen kein Unterschied festzustellen ist (Abbildung 4.6 A).

Bisher ist eine Rolle natürlicher Killerzellen lediglich in der Abstoßung von Knochenmark, nicht aber in der Abstoßungsreaktion gegen solide Organtransplantate beschrieben (zur Übersicht: Yu et al., 1992; Lanier, 1995). Der Nachweis natürlicher Killerzellen in allogenen Herztransplantaten eröffnet die Hypothese, dass diese auch funktionell in der Abstoßung von Organtransplantaten eine wichtige Bedeutung einnehmen.

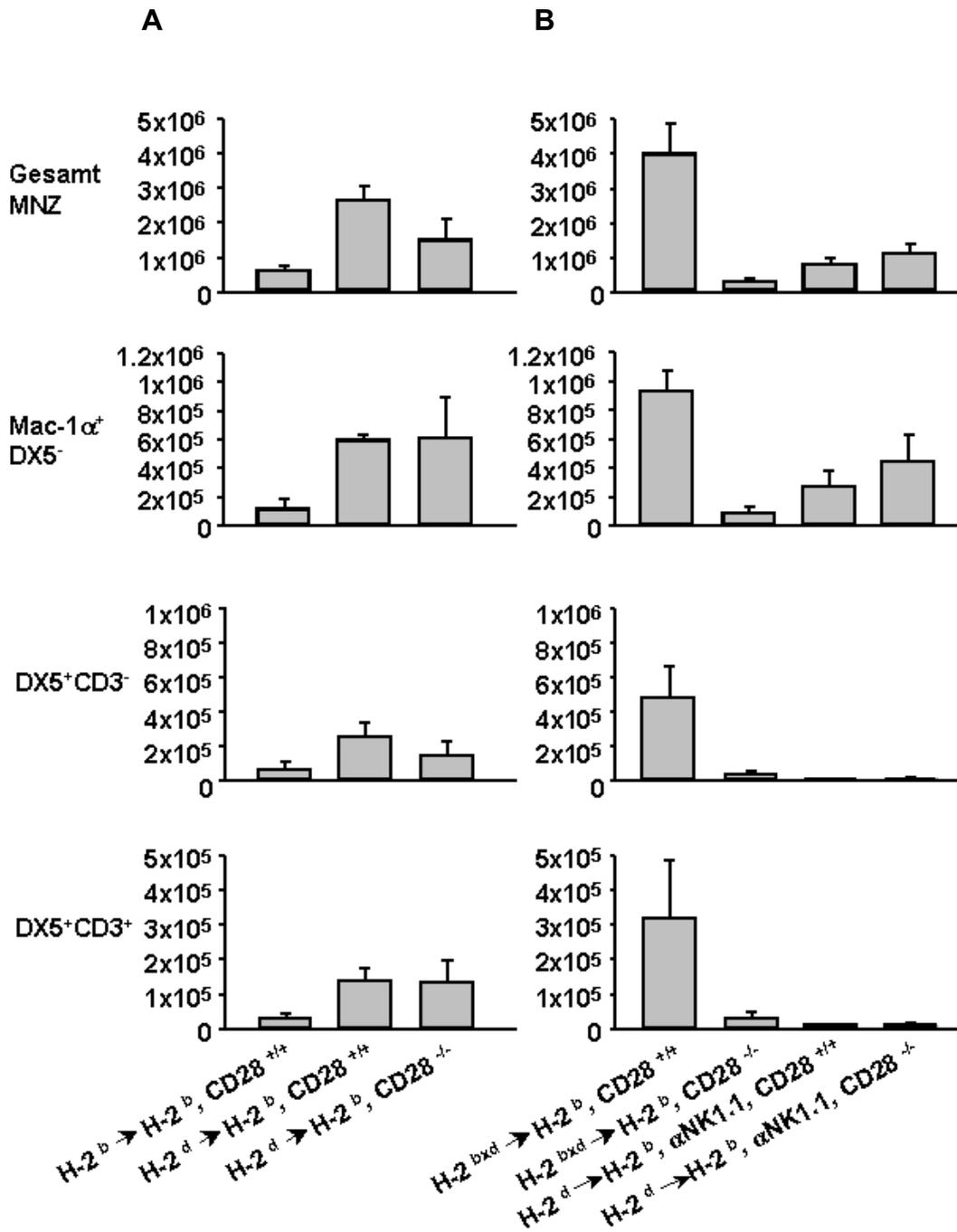


Abbildung 4.6: Quantitative Analyse der Transplantat infiltrierenden Makrophagen, NK- und NK-T-Zellen.

(A) Syngene Kontrolle, allogene Transplantation in Wildtyp- und CD28-defiziente Empfänger.

(B) Semiallogene Transplantation und allogene Transplantation unter Depletion NK1.1 positiver Zellen.

Im Vergleich zu Wildtyp-Empfängern ist in CD28-defizienten Empfängern die Infiltration von DX5⁺CD3⁻, nicht aber von DX5⁺CD3⁺ Zellen gering reduziert (A). Semiallogene Transplantation in CD28-defiziente Empfänger führt zu einer drastischen Reduktion der Infiltration von Makrophagen, NK- und NK-T-Zellen. Nach *in vivo* Depletion NK1.1 positiver Zellen sind DX5⁺CD3⁻ und DX5⁺CD3⁺ Zellen in Transplantaten praktisch nicht mehr nachweisbar (B).

NK-Zellen und zumindest Subpopulationen von NK-T-Zellen exprimieren inhibitorische Rezeptoren, die in der Maus der Ly-49-Familie angehören und mit Selbst-MHC-I-Molekülen interagieren (Ortaldo et al., 1998; Skold and Cardell, 2000). Die Aktivierung von NK- (und NK-T-) Zellen wird nicht allein durch aktivierende Rezeptoren, sondern durch das komplexe Zusammenspiel aktivierender und inhibitorischer Signalwege reguliert (siehe 1.1.5). Hierbei hat sich in einigen *in vitro* Modellen gezeigt, dass eine über Ly-49-Rezeptoren vermittelte Inhibition in bestimmten Situationen in der Lage ist, aktivierende Signale zu überspielen und so eine Aktivierung der Zellen zu verhindern. Gelänge es, *in vivo* bei Transplantation Liganden für eine Signaltransduktion über MHC-I-spezifische inhibitorische Rezeptoren zur Verfügung zu stellen, so ließe sich dadurch möglicherweise eine Aktivierung von NK und NK-T-Zellen verhindern.

Zur Untersuchung des Einflusses der Anwesenheit von Selbst-MHC-Molekülen wurden semi-allogene (H-2^{bxd}) Transplantate in C57BL/6 Wildtyp- und CD28-defiziente Mäuse transplantiert unter der Annahme, dass die Interaktion von Selbst-MHC-I mit inhibitorischen Rezeptoren auf NK- und NK-T-Zellen deren Aktivierung verhindern oder dämpfen könnte.

4.4 SEMIALLOGENE HERZTRANSPLANTATE WERDEN VON CD28-DEFIZIENTEN EMPFÄNGERN AKZEPTIERT

Wie bereits von Stefan Maier gezeigt (Maier, 1998), werden semiallogene Herztransplantate von CD28^{-/-}, nicht aber von CD28^{+/+} Mäusen dauerhaft akzeptiert (siehe Abbildung 2.1). In der Immunhistochemie zeigen semiallogene Herzen, die in CD28-defiziente Mäuse transplantiert wurden, im Vergleich zu den abstoßenden Gruppen ein insgesamt deutlich reduziertes Infiltrat. Im Unterschied zu allogenen Herzen, die in CD28-defiziente Mäuse transplantiert wurden und bei denen im Vergleich zur allogenen Transplantation in Wildtyp-Empfänger eine Reduktion nur der CD4⁺ T-Zellen im Transplantat beobachtet wurde, scheinen in der semiallogenen Situation auch CD8⁺ und Mac-1⁺ Zellen deutlich reduziert zu sein (Abbildung 4.1). Nachdem in allogenen Transplantaten eine deutliche Infiltration von Zellen, die bekanntermaßen inhibitorische MHC-I-spezifische Rezeptoren exprimieren (NK- und NK-T-Zellen), gefunden wurde, stellt sich insbesondere die Frage, ob die Infiltration dieser Zellpopulationen bei Anwesenheit von Selbst-MHC-I-Molekülen auf dem Transplantat reduziert ist.

Semiallogene Transplantate aus CD28-defizienten und Wildtyp-Mäusen wurden daher ebenfalls mittels Kollagenase verdaut und durchflußzytometrisch analysiert.

4.4.1 CD28-Defizienz führt bei semiallogener Transplantation zur Reduktion der Infiltration von CD8⁺ T-Zellen

Im Gegensatz zu den abstoßenden Gruppen (allogen in Wildtyp oder CD28^{-/-}, semiallogen in Wildtyp) ist in semiallogen in CD28^{-/-} Mäuse transplantierten Herzen die Gesamtzahl isolierter

mononukleärer Leukozyten pro Transplantat bis auf ein der syngenon Transplantation vergleichbares Niveau reduziert (Abbildung 4.3 B). Neben der bei den allogenen Herztransplantaten in CD28^{-/-} Empfängern beobachteten Reduktion der Infiltration von CD4⁺ T-Zellen ist in semiallogenen Herztransplantaten in CD28-defizienten Empfängern auch die Zahl infiltrierender CD8⁺ T-Zellen bis auf der syngenon Kontrollgruppe vergleichbare Werte reduziert (Abbildung 4.7 und Abbildung 4.3 B). In Wildtyp-Empfängern dagegen scheint die semiallogene im Vergleich zur vollallogenen Transplantation keinen wesentlichen Einfluss auf die zelluläre Infiltration zu haben, wenn überhaupt, so kommt es eher zu einer Zunahme der Infiltration aller untersuchten Zellpopulationen (Abbildung 4.3 B und Abbildung 4.6 B).

Semiallogene Transplantation in Abwesenheit von CD28 führt also dazu, dass nun auch die - in der allogenen Situation offensichtlich von einer Kostimulation über CD28 weniger abhängigen - CD8⁺ T-Zellen kaum noch in das Transplantat rekrutiert werden und/oder dort proliferieren können.

4.4.2 Reduktion der Infiltration von NK und NK-T-Zellen bei Transplantation semiallogener Herzen in CD28^{-/-} Mäuse

Semiallogene Transplantation führt in CD28-defizienten Empfängern zu einer drastischen Reduktion der Anzahl infiltrierender NK- und NK-T-Zellen auf vergleichbare niedrige Werte wie in der syngenon Kontrolle.

Die Mechanismen der Akzeptanz semiallogener Herzen in CD28-defizienten Mäusen sind bisher nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung ist, dass auf semiallogenen Transplantaten exprimiertes Selbst-MHC-I mit inhibitorischen Rezeptoren auf NK- und NK-T-Zellen interagiert und so deren Aktivierung verhindert, während in Anwesenheit von CD28 das inhibitorische Signal durch die aktivierende Funktion des Kostimulationsmoleküls überspielt wird. Diese Vorstellung wird durch den Nachweis von NK- und NK-T-Zellen in abstoßenden Gruppen unterstützt; diese Zellpopulationen sind in den semiallogen in CD28^{-/-} Mäuse transplantierten Herzen reduziert.

In vitro lässt sich der Proliferationsdefekt CD28-defizienter T-Zellen durch Zugabe von exogenem IL-2 ausgleichen (Shahinian et al., 1993). Auch *in vivo* ist denkbar, dass CD28-defiziente T-Zellen von anderen Zellpopulationen „Hilfe“ in Form von Zytokinen oder auch durch direkte Zell-Zell-Interaktionen erhalten und dann trotz Kostimulationsdefekt aktiviert werden. Im weiteren soll das Expressionsmuster verschiedener Zytokine in den beschriebenen Transplantationsgruppen untersucht werden.

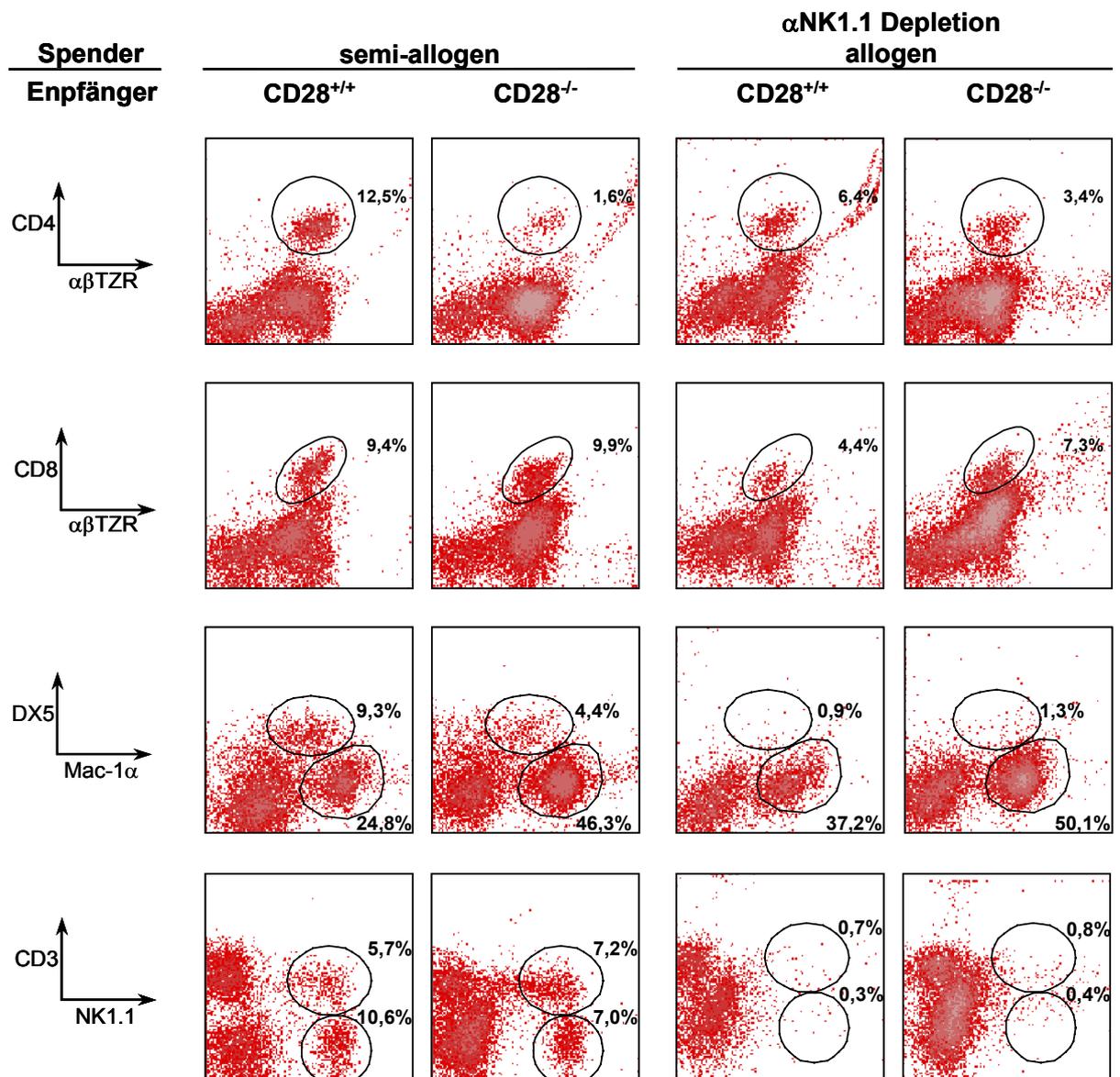


Abbildung 4.7: Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen, NK- und NK-T-Zellen in semi-allogene Transplantate sowie in allogen unter NK-Depletion in CD28^{+/+} und CD28^{-/-} Empfänger transplantierte Herzen.

Mononukleäre Zellen wurden wie in Abbildung 4.2 isoliert und durchflußzytometrisch analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die absoluten Zahlen infiltrierender Zellen gemeinsam mit den in syngenen und allogenen Transplantation ermittelten Zahlen in Abbildung 4.3 dargestellt.

4.5 UNTERSUCHUNG DER ZYTOKIN-EXPRESSION IN HERZTRANSPLANTATEN MITTELS RNASE PROTECTION-ASSAY UND SEMIQUANTITATIVER RT-PCR

4.5.1 Methodische Vorarbeiten

Für die semiquantitative RT-PCR von IFN γ wurde ein Kontrollfragment aus dem im Labor vorhandenen bakteriellen Klon aufgereinigt. Die isolierte Plasmid-DNS wurde mit *EcoR1* verdaut und das geschnittene IFN γ -Kontrollfragment durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Photometrische Bestimmung bei 260 nm ergab eine DNS-Konzentration von 2,9 $\mu\text{g/ml}$, für die semiquantitative kompetitive RT-PCR stellten sich 3,5 μl einer 1:390625 Verdünnung dieser Präparation ($c \approx 0,7 \text{ ng/ml}$) als geeignete Menge Kontrollfragment heraus.

Für die Analyse der Zytokin-mRNA-Expression in Herztransplantaten wurden die Methoden der semiquantitativen PCR und des RNase Protection-Assays verwendet. Exemplarisch konnte anhand der Untersuchung von IFN γ gezeigt werden, dass die Methoden grundsätzlich vergleichbar sind (Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9), allerdings erwies sich die semiquantitative RT-PCR als wesentlich arbeitsaufwendiger, so dass im weiteren präferentiell der RNase Protection-Assay verwendet wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität konnte im RNase Protection-Assay kein Signal für IL-2 mRNS detektiert werden, diese war aber in der RT-PCR deutlich nachweisbar. Die IL-2 Transkription in Transplantaten wurde daher mittels semiquantitativer PCR untersucht, ebenso wie die Transkription von IL-12, da die entsprechende Bande im RNase Protection-Assay nur schwer detektierbar war.

4.5.2 Verringerte Transkription inflammatorischer Zytokine in semiallogen in CD28^{-/-} Mäuse transplantierten Herzen im Vergleich zu allogenen in Wildtypmäuse transplantierten Herzen

In semiallogenen Herzen, die in CD28-defiziente Empfänger transplantiert wurden, ist die Transkription mehrerer proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, IFN γ) im Vergleich zu abstoßenden Gruppen deutlich, teilweise bis auf das Niveau der syngenen Kontrollen, reduziert (Abbildung 4.8). Abbildung 4.9 zeigt die Untersuchung der IFN γ -Transkription mit der semiquantitativen PCR. Vergleichbar mit den im RNase Protection-Assay erhaltenen Ergebnissen zeigte auch diese Methode abgesehen von syngenen Kontrollen die niedrigsten Transkriptionsraten in semiallogen in CD28-defiziente Empfänger transplantierten Herzen. IFN γ ist ein proinflammatorisches Zytokin, das hauptsächlich von T_H1-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen produziert wird und u.a. zur Aktivierung von Makrophagen und Endothelzellen sowie zur vermehrten Expression von MHC-Molekülen führt. Gefördert wird die IFN γ -Produktion von T- und NK-Zellen durch IL-12, welches darüber hinaus T- und NK-Zellen zur verstärkten

Proliferation und zytolytischen Aktivität anregt sowie bei T-Zellen zu einer T_H1 -Differenzierung führt (zur Übersicht siehe Trinchieri, 1998; Abbas et al., 2000a). Da die IL-12-Transkription nur von jeweils zwei Präparaten untersucht wurde, können hierzu noch keine definitiven Aussagen getroffen werden, tendenziell scheint die IL-12 Transkription in Abwesenheit von CD28 – unabhängig von der Anwesenheit von Selbst-MHC – im Vergleich zu allogenen in Wildtyp transplantierten Gruppen verringert zu sein (Abbildung 4.10 A und C).

Das vorwiegend von T-Zellen produzierte Zytokin IL-2 ist in allogenen Transplantaten im Vergleich zu syngenem Kontrollen deutlich hochreguliert. Sowohl die Abwesenheit von CD28 als auch die Verwendung semiallogener Transplantate führt im Vergleich dazu zu einer Reduktion der IL-2-Transkription, es lässt sich aber kein klarer Unterschied zwischen den akzeptierten semiallogenen Transplantaten in CD28-defizienten Empfängern und semiallogen in Wildtyp- oder allogenen in $CD28^{-/-}$ Mäuse transplantierten Herzen erkennen (Abbildung 4.10).

Als weiterer Überlebensfaktor für T-Zellen ist in letzter Zeit IL-15 immer mehr in den Vordergrund gerückt (Perera, 2000; Waldmann et al., 2001). Bei der Untersuchung der Transkription von IL-15 mittels RT-PCR (zwei Experimente) und RNase Protection-Assay (1 Experiment) ergab sich übereinstimmend überraschenderweise eine erniedrigte Transkription von IL-15 in allo- und semiallogenen Transplantaten im Vergleich zu syngenem Kontrollen (Abbildung 4.10 A, D, E; zur Synopsis sind die Daten aus PCR und RNase Protection-Assay in einem Diagramm dargestellt).

Interessanterweise ist die Akzeptanz von semiallogenen Herzen in CD28-defizienten Empfängern nicht mit einer erhöhten Transkription des inhibitorischen Zytokins IL-10 verbunden (Abbildung 4.8), ebenso kann kein T_H2 -Shift als Erklärung für die Akzeptanz herangezogen werden, da sich auch in nichtquantitativer PCR als sensitivste Nachweismethode wiederholt keine IL-4 Transkription nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt).

Die $TNF\alpha$ Transkription ist in allogenen und semiallogenen Transplantaten deutlich höher als in syngenem Kontrollen, es lässt sich aber kein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen voll- und semiallogenen Gruppen erkennen. Für $TGF\beta_3$ findet sich im Vergleich zu syngenem Kontrollen in allogenen und semiallogenen Transplantaten eine verringerte Transkription, diese Gruppen unterscheiden sich jedoch untereinander nicht (Abbildung 4.8).

Für weitere untersuchte Zytokine, u.a. $TGF\beta_1$ und $TGF\beta_2$, konnten keine klaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Transplantationsgruppen festgestellt werden.

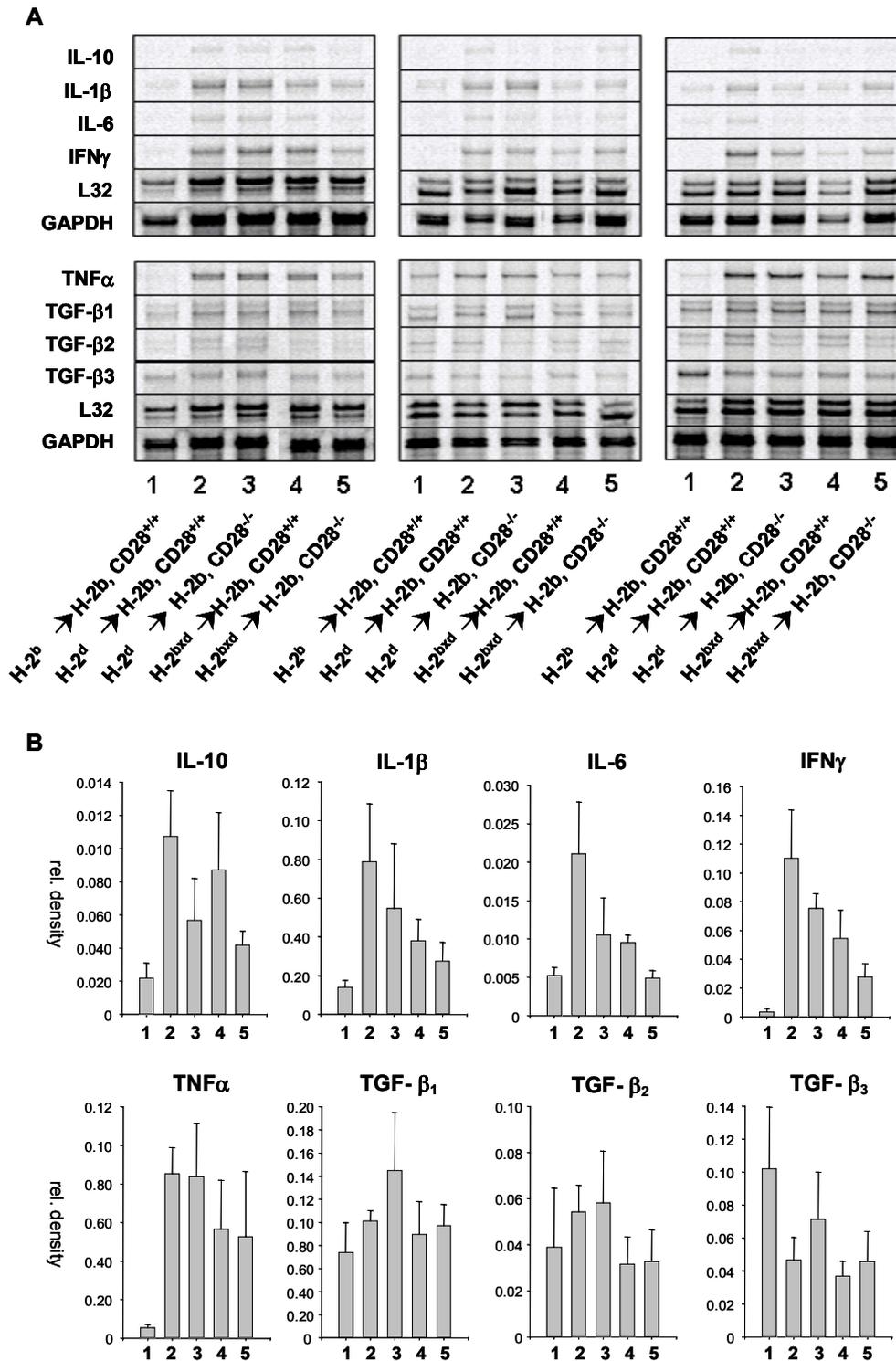


Abbildung 4.8: Verringerte Transkription inflammatorischer Zytokine in semiallogen in CD28-defiziente Mäuse transplantierten Herzen.

Aus an Tag 5 explantierten Herztransplantaten wurde Gesamt-RNS isoliert und mittels RNase Protection-Assay die Menge an transkribierter mRNS für verschiedene Zytokine analysiert. In semiallogenen Herzen, die in CD28^{-/-} Empfänger transplantiert wurden, ist die Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-6 und IFNγ im Vergleich zu allogenen Herzen, die in WT Empfänger transplantiert wurden, deutlich reduziert.

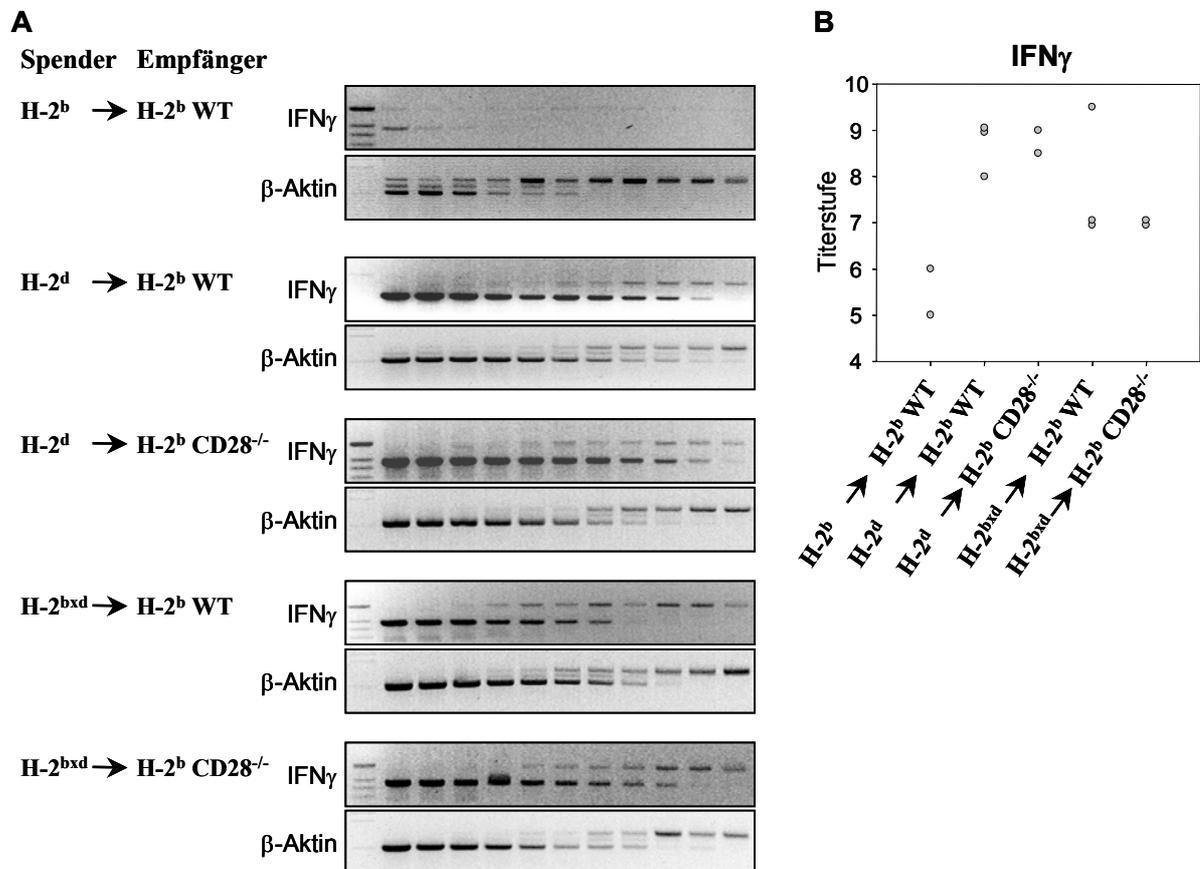


Abbildung 4.9: IFN γ Transkription in Herztransplantaten – semiquantitative RT-PCR.

(A) Herztransplantate wurden an Tag 5 explantiert, gesamtzelluläre RNS isoliert und mittels RT-PCR auf enthaltene IFN γ mRNA untersucht. Durch parallel durchgeführte semi quantitative RT-PCR für β -Aktin wurden für IFN γ erhaltene Titerstufen jeweils auf eine Titration von β -Aktin bis zur siebten Verdünnungsstufe normalisiert. (B) Auswertung der semi quantitativen RT-PCR von (A)

Die Akzeptanz von semiallogenen Herzen in CD28-defizienten Empfängern korreliert also mit einer verringerten Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-6 und IFN γ . Die gesehene Reduktion der IFN γ Transkription könnte eine mangelnde Aktivierung von NK-Zellen widerspiegeln und ist daher mit der Hypothese vereinbar, dass diese in Anwesenheit von Selbst-MHC-I vermindert aktiviert werden. Allerdings lässt sich aus den gezeigten Daten nicht ableiten, welche Zellen im Transplantatinfiltat die Produzenten von IFN γ sind; die Reduktion der IFN γ Transkription könnte auch von einer verminderten Aktivierung der T-Zellen – oder einer Kombination beider Effekte – herrühren.

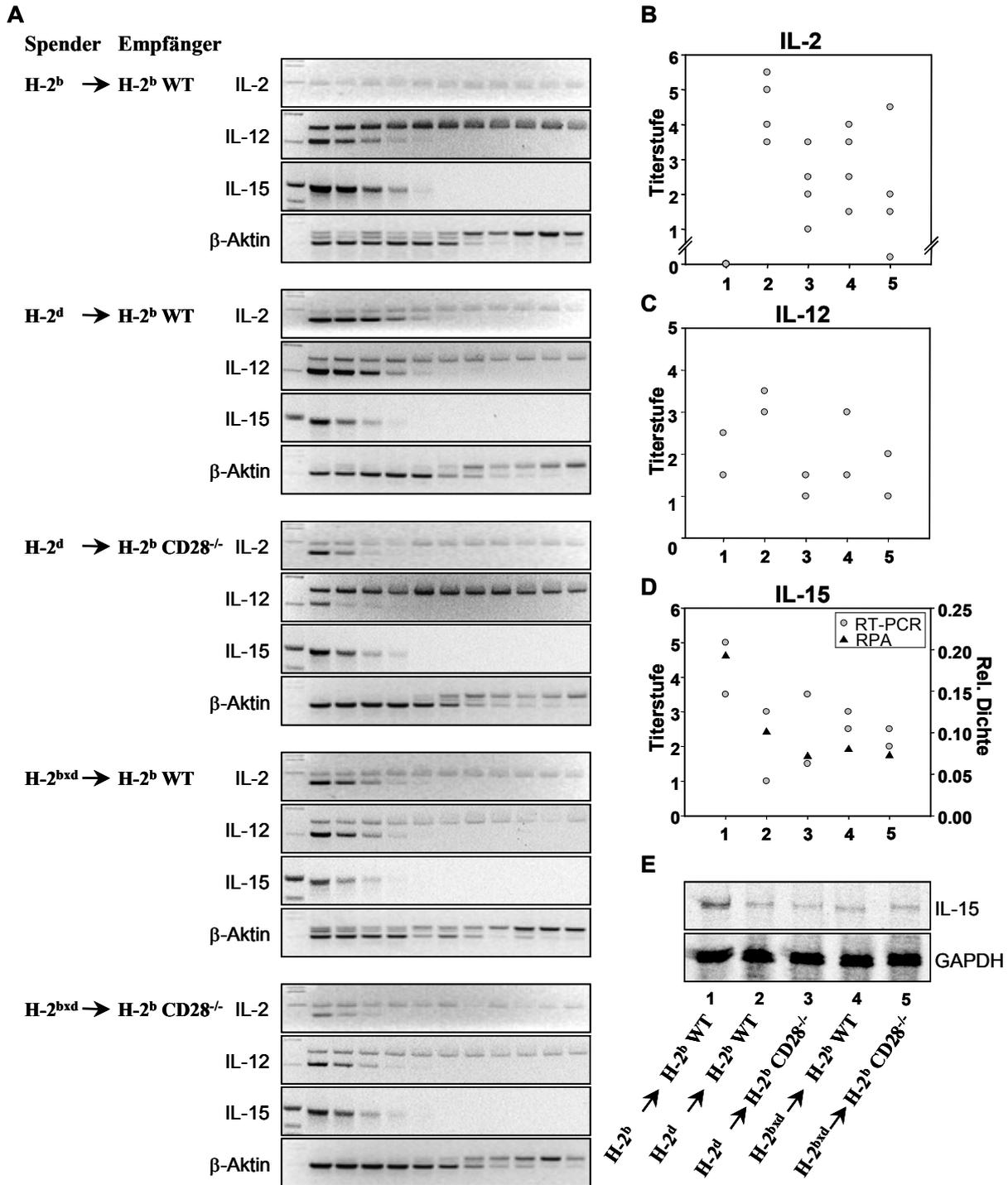


Abbildung 4.10: Untersuchung der Zytokintranskription in Herztransplantaten mittels semiquantitativer RT-PCR und RNase Protection-Assay.

Aus an Tag 5 explantierten Herzen wurde Gesamt-RNS isoliert und die Zytokintranskription mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Für die jeweiligen Zytokine ermittelte Titerstufen wurden auf β -Aktin (Titerstufe 7) normalisiert (A-D). Die IL-15 Transkription wurde mittels RT-PCR (A,D) und RNase Protection-Assay (D,E) bestimmt.

4.6 DEUTLICH VERLÄNGERTES ÜBERLEBEN ALLOGENER HERZ- TRANSPLANTATE DURCH DIE *IN VIVO* DEPLETION NK1.1 POSITIVER ZELLEN IN CD28^{-/-} MÄUSEN

Falls entsprechend der aufgestellten Hypothese NK- und/oder NK-T-Zellen an der Abstoßung von allogenen Transplantaten durch CD28-defiziente Empfänger wesentlich beteiligt sind, so müsste *in vivo* Depletion NK1.1 exprimierender Zellen zu einer Verlängerung des Transplantat-Überlebens führen. Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von NK1.1 exprimierenden Zellen bei der Transplantatabstoßung wurden daher allogene Herzen in CD28-defiziente und Wildtyp-Empfänger, die durch wiederholte Injektionen eines monoklonalen Antikörpers (Klon PK136) von NK1.1 exprimierenden Zellen depletiert wurden, transplantiert. Hierzu musste zunächst ein geeignetes Depletionsprotokoll erarbeitet und dessen Effektivität gezeigt werden.

4.6.1 Nachweis der effektiven Depletion NK1.1 positiver Zellen durch durchflußzytometrische Analyse von Leukozyten aus peripherem Blut

Die Depletionseffizienz des mAK PK136 wurde durch durchflußzytometrische Analysen von Leukozyten aus peripherem Blut kontrolliert. In Vorversuchen zeigte sich, dass C57BL/6-Mäuse 14 h nach i.v. Injektion von 100 µg anti-NK1.1 mAK im peripheren Blut zwar praktisch keine NK1.1⁺ Zellen, aber noch eine kleine Population von DX5⁺ Zellen aufweisen. 48 h nach Injektion war weiterhin keine NK1.1⁺ Zellpopulation zu sehen, aber zu diesem Zeitpunkt waren DX5⁺ Zellen im Vergleich zur Messung nach 14 h noch weiter reduziert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass es 14 h nach einmaliger Injektion von anti-NK1.1 mAK zwar zu einer Absättigung der NK1.1-Rezeptoren gekommen ist, aber noch Zellen vorhanden sind, die sich mittels eines Antikörpers mit anderer Spezifität für ein koexprimiertes Oberflächenmolekül anfärben lassen. Erst 48h nach Injektion des Antikörpers scheinen die mit Antikörper beladenen Zellen dann effektiv durch Komplement-vermittelte Lyse depletiert zu sein. Eine vollständige Depletion NK1.1 positiver Zellen zum Zeitpunkt der Transplantation erscheint bei Verwendung von PK136 besonders wichtig, da dieser *in vitro* stimulierende Eigenschaften hat (Karlhofer and Yokoyama, 1991). NK- und NK-T-Zellen, die PK136 gebunden haben, aber nicht eliminiert sind, könnten also sogar durch die Antikörperbehandlung aktiviert sein. Die Injektionen von monoklonalem Antikörper wurden daher bereits zwei Tage vor Transplantation begonnen.

Wildtyp- und CD28-defizienten Empfängern wurde 100 µg PK136 bzw. Kontroll-Maus IgG zwei Tage vor und einen Tag nach Transplantation allogener Herzen i.v. und 3, 5, 9, 13, 17, und 21 Tage nach Transplantation (bzw. bis zur Abstoßung) i.p. injiziert. Abbildung 4.11 zeigt die zur Kontrolle der Depletion durchgeführte Analyse DX5 exprimierender Zellen im peripheren Blut transplantiertter Mäuse. Die Untersuchung der Expression von DX5 und NK1.1 auf peripheren

Blut-Leukozyten unbehandelter Mäuse (vor Depletion) zeigt ein unterschiedliches Expressionsmuster von NK1.1 auf DX5⁺CD3⁻ und DX5⁺CD3⁺ Zellen (Abbildung 4.11 A,B,C): in der CD3⁺ Population ist ein deutlich geringerer Anteil der DX5⁺ Zellen auch NK1.1⁺. Dies ist deshalb von Interesse, da der Marker DX5 zur Depletionskontrolle verwendet werden soll, um sicherzustellen, dass das Verschwinden der Population in der durchflußzytometrischen Untersuchung auch eine effektive Depletion *in vivo* widerspiegelt und nicht lediglich durch eine Absättigung der Rezeptoren mit Antikörper verursacht wird. Nach Depletion lassen sich keine deutlichen DX5⁺ Populationen mehr im peripheren Blut nachweisen (Abbildung 4.11 D, E). Abbildung 4.11 F zeigt, dass in anti-NK1.1 behandelten Mäusen im Gegensatz zu Maus IgG behandelten Mäusen praktisch keine NK-Zellen (DX5⁺CD3⁻) mehr im peripheren Blut vorhanden sind. Für DX5⁺CD3⁺ NK-T-Zellen lässt sich die Depletion nicht klar nachweisen, was zum einen aus der erläuterten Verteilung der NK1.1 exprimierenden Populationen verständlich ist, sich zum anderen auch dadurch erklären lässt, dass NK-T-Zellen bereits in unbehandelten Mäusen nur eine extrem kleine Population im peripheren Blut darstellen und eine noch weitere Reduktion daher mit der angewandten Methodik dort nicht zuverlässig zu detektieren ist. Insgesamt zeigt die Analyse DX5 positiver Zellen in peripherem Blut eine zufriedenstellend effektive Depletion.

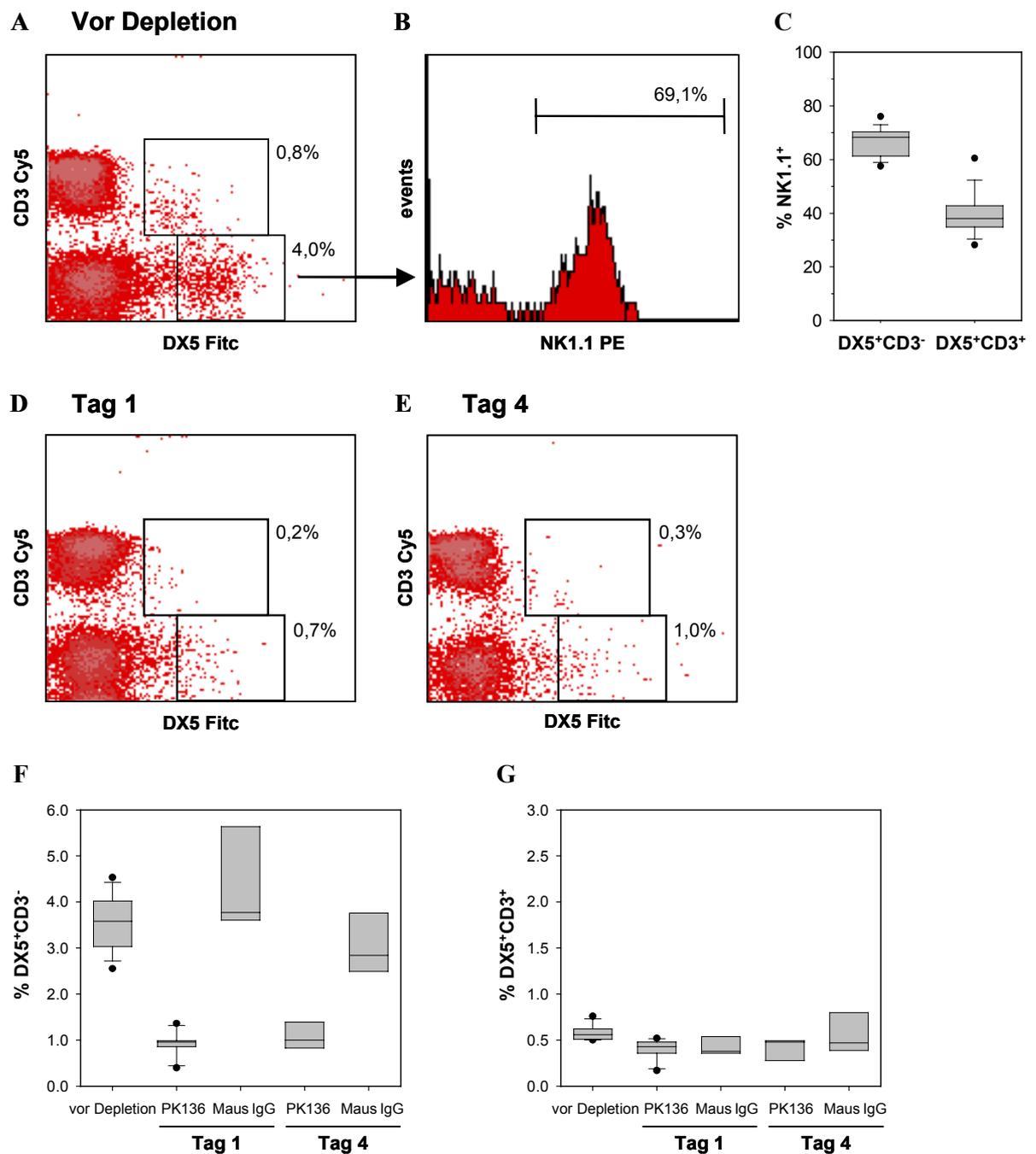


Abbildung 4.11: NK und NK-T-Zellen in peripherem Blut vor Injektion von mAK PK136 sowie 1 und 4 Tage nach Transplantation.

C57BL/6 WT und CD28^{-/-} Mäusen wurde vor Injektion der ersten Antikörperdosis sowie 1 und 4 Tage nach Transplantation Blut aus einer Schwanzvene entnommen und nach Erythrozyten-Lyse durchflußzytometrisch untersucht. DX5⁺CD3⁻ Zellen sind zu einem größeren Teil gleichzeitig NK1.1⁺ als DX5⁺CD3⁺ Zellen (A-C). Tag 1 und 4 nach HTX sind bei mit mAK PK136 behandelten Empfängern praktisch keine DX5⁺CD3⁻ Zellen in peripherem Blut nachweisbar (D-F, die erhaltenen Werte entsprechen der Isotyp-Kontrolle). Kontroll-AK behandelte Empfänger zeigen keine Reduktion DX5⁺CD3⁻ Zellen in peripherem Blut (F).

4.6.2 Depletion von NK1.1 positiven Zellen führt zu einem deutlich verlängerten Überleben allogener Herztransplantate in CD28-defizienten, nicht aber in Wildtyp- Mäusen

Die Injektion von anti-NK1.1 monoklonalem Antikörper führt in CD28-defizienten, nicht aber in Wildtyp-Mäusen zu einer deutlichen Verlängerung des Transplantat-Überlebens (Abbildung 4.12). Während NK1.1 depletierte Wildtyp-Mäuse allogene Herztransplantate mit einer den unbehandelten Wildtyp-Mäusen vergleichbaren Kinetik (Mittlere Überlebenszeit (MÜZ) $8,0 \pm 0,7$ bzw. $7,7 \pm 1,2$ Tage, siehe auch Abbildung 2.1) abstoßen, akzeptieren NK1.1 depletierte CD28-defiziente Empfänger allogene Herzen deutlich länger (MÜZ $26,4 \pm 6,1$ Tage) als unbehandelte (MÜZ $10,7 \pm 2,2$ Tage, Abbildung 2.1) oder Kontroll-IgG behandelte CD28-defiziente Empfänger (MÜZ $11,0 \pm 1,0$ Tage).

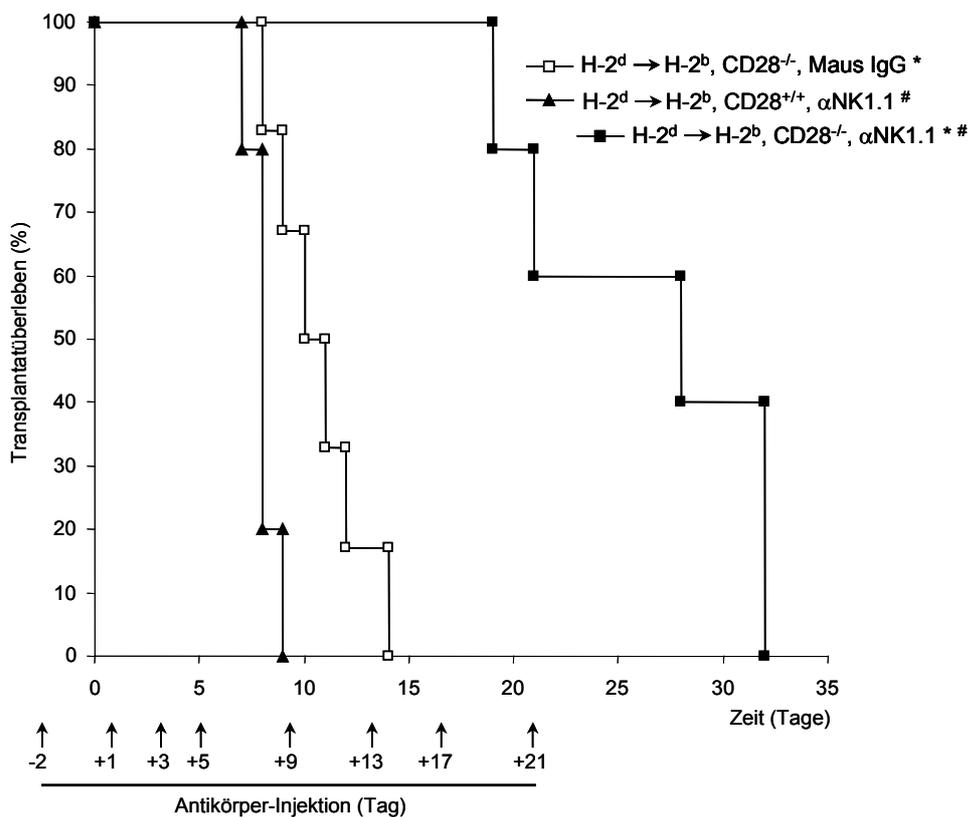


Abbildung 4.12: *In vivo* Depletion NK1.1 positiver Zellen führt in CD28-defizienten Empfängern zu deutlich verlängertem Transplantat-Überleben.

CD28^{+/+} und CD28^{-/-} Empfänger wurden entsprechend dem abgebildeten Schema mit anti-NK1.1 (PK136) oder Kontroll-Maus IgG behandelt und das Überleben allogener Herztransplantate mittels Fingerpalpation überwacht. anti-NK1.1 behandelte CD28-defiziente Empfänger zeigen ein deutlich verlängertes Transplantat-Überleben im Vergleich zu anti-NK1.1 behandelten CD28^{+/+} Empfängern und Kontroll-Maus IgG behandelten CD28^{-/-} Empfängern. * $p = 0,042$, # $p = 0,002$ im Log Rank-Test.

4.6.3 Depletion von NK1.1 positiven Zellen führt zu einer Reduktion des mononukleären Infiltrats in allogenen Herztransplantaten

Allogene Transplantate aus anti-NK1.1 behandelten Empfängern wurden am Tag 5 entnommen und das zelluläre Infiltrat mittels Immunhistochemie und Durchflußzytometrie untersucht. In der Immunhistochemie ließ sich bezüglich des Infiltrats sowohl in CD28-defizienten- als auch in Wildtyp-Empfängern kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu den entsprechenden nicht depletierten Gruppen erkennen. In beiden Gruppen ließ sich ein deutliches Infiltrat Mac-1 α positiver Zellen anfärben (Abbildung 4.13). Wie bereits bei den nicht depletierten Gruppen beobachtet, war auch in NK1.1-depletierten CD28-defizienten Empfängern die Infiltration CD4⁺ Zellen im Vergleich zu NK1.1-depletierten Wildtyp-Empfängern deutlich reduziert (Daten nicht gezeigt). Unter NK1.1 Depletion schien in allogenen Herztransplantaten in CD28-defizienten Empfängern auch die Infiltration CD8⁺ Zellen im Vergleich zu den nicht-depletierten CD28^{-/-}-Empfängern tendenziell verringert, während sie in Wildtyp-Empfängern im wesentlichen der Infiltration in der nicht depletierten Gruppe zu entsprechen schien (Abbildung 4.13 und Abbildung 4.1).

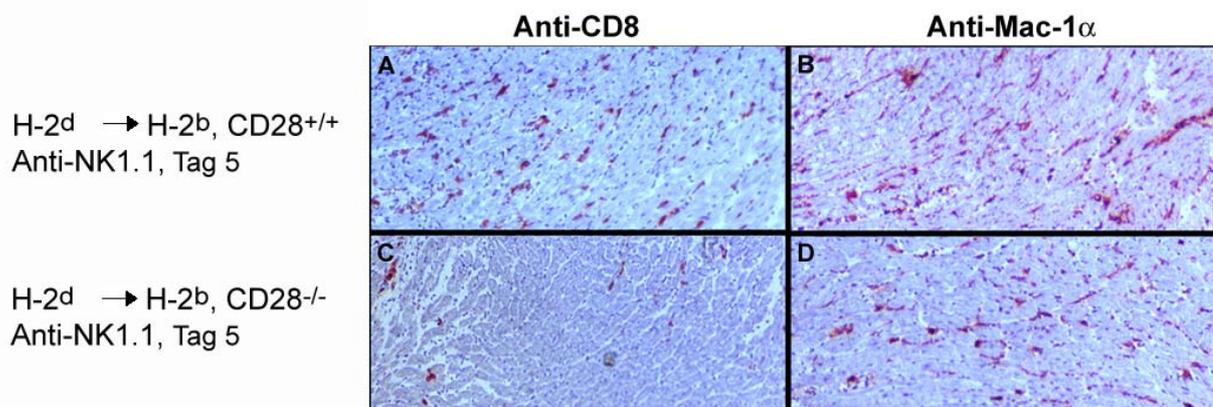


Abbildung 4.13: Immunhistochemische Färbungen von Herztransplantaten unter *in vivo* Depletion NK1.1 exprimierender Zellen.

Kryoschnitte von an Tag 5 nach HTX entnommenen Organen wurden mit anti-CD8 und anti-Mac-1 α inkubiert und gebundene Antikörper über einen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Die Depletion von NK1.1 positiven Zellen scheint zu einer verminderten Einwanderung von CD8⁺ Zellen in das Transplantat zu führen.

Sowohl in den CD28^{-/-} als auch in den Wildtyp-Empfängern war die Gesamtzahl der nach Kollagenase-Verdau wie oben beschrieben isolierten mononukleären Zellen unter NK1.1 Depletion im Vergleich zu unbehandelten Gruppen reduziert. DX5⁺CD3⁻ NK- und DX5⁺ CD3⁺ NK-T-Zellen konnten in der durchflußzytometrischen Analyse praktisch nicht nachgewiesen und somit die effektive Depletion (auch der DX5⁺CD3⁺ Zellen, deren Depletion im peripherem Blut nicht zuverlässig detektiert werden konnte) hier bestätigt werden. Die durchflußzytometrische

Analyse zeigt auch in den depletierten Gruppen eine ausgeprägtere Reduktion infiltrierender CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen bei CD28^{-/-} Empfängern, die auch hier zu einer Umkehrung der CD4/CD8 Ratio führt (Abbildung 4.2, Abbildung 4.3, Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6).

Allogene Herztransplantate in NK1.1 depletierten CD28-defizienten Empfängern werden deutlich verzögert abgestoßen und zeigen nur ein geringes mononukleäres Infiltrat, während NK1.1 depletierte Wildtyp-Empfänger allogene Transplantate nicht verzögert abstoßen. Obwohl es in der Immunhistochemie den Anschein hat, konnte in der Analyse der aus den Transplantaten isolierten mononukleären Zellen – trotz des deutlichen Unterschieds beim Transplantat-Überleben – kein Unterschied in der Stärke des Infiltrats zwischen depletierten Wildtyp- und CD28-defizienten Empfängern gezeigt werden (Abbildung 4.6).

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit schließen, dass NK1.1 positive Zellen eine wichtige Rolle bei der Abstoßung von soliden Organtransplantaten spielen. Möglicherweise wird die Aktivierung von NK-Zellen bei der Transplantation semiallogener Transplantate über die Interaktion mit Selbst-MHC-I-Molekülen über inhibitorische Rezeptoren verhindert. Deutlich wird dies in Abwesenheit des Kostimulationsmoleküls CD28: In CD28^{-/-} Mäusen werden semi-allogene Herzen akzeptiert und allogene Herzen nach Depletion von NK1.1 exprimierenden Zellen deutlich verzögert abgestoßen.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde ein murines Herztransplantationsmodell zur Untersuchung der Transplantatabstoßung in An- und Abwesenheit von CD28-Kostimulation verwendet. CD28-defiziente Mäuse sind prinzipiell zu einer akuten, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nur gering verzögerten, Abstoßung von allogenen Transplantaten in der Lage. Im Gegensatz dazu werden semiallogene Transplantate von CD28-defizienten Empfängern ohne weitere Immunsuppression langfristig akzeptiert (siehe Abbildung 2.1). Dieser auffällige und zunächst überraschende Befund bildet die Grundlage dafür, dieses Modell zur Untersuchung der Mechanismen der Transplantatabstoßung in Abwesenheit von CD28-mediierter Kostimulation einzusetzen.

5.1 TRANSPLANTATABSTOßUNG IN ABWESENHEIT VON KOSTIMULATION UND UNTER KOSTIMULATIONSBLOCKADE

Die Blockierung von Kostimulationsmolekülen erscheint als ein vielversprechender Ansatz für die Therapie von Transplantatempfängern. Die Abstoßung von soliden Organtransplantaten in Abwesenheit von Kostimulation oder unter Kostimulationsblockade ist von mehreren Gruppen in verschiedenen Modellen untersucht worden. Die Ergebnisse dieser Studien sind teils widersprüchlich, wobei sich die Unterschiede nach dem derzeitigen Stand der Forschung nicht vollständig erklären lassen. Im folgenden soll ein Überblick über von unterschiedlichen Gruppen durchgeführte Untersuchungen zur Transplantatabstoßung in Abwesenheit von Kostimulation bzw. unter Kostimulationsblockade gegeben werden.

In der Literatur gab es zunächst Hinweise darauf, dass Inhibition der CD28-Kostimulation die Abstoßung von allogenen Transplantaten erfolgreich verhindern könnte. *In vitro* Studien hatten gezeigt, dass alloantigene Stimulation in Abwesenheit von Kostimulation zu antigenspezifischer T-Zell-Anergie oder Apoptose führen kann (Razi-Wolf et al., 1992; zur Übersicht siehe Johnson and Jenkins, 1993). Turka *et al.* konnten in einem Rattenmodell (Brown Norway [BN] → Lewis [LEW]) durch tägliche Injektion von CTLA-4-Ig (0,5 mg/Tag) über 7 Tage ein deutlich verlängertes Transplantat-Überleben und in ca. 20 % der Fälle Langzeit-Überleben erzielen (Turka et al., 1992). Die in unterschiedlichen murinen Modellen mit Kostimulationsdefizienz oder -blockade gewonnenen Ergebnisse sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 dargestellt. Pearson *et al.* zeigten, dass Injektion von CTLA-4-Ig nach Herztransplantation (BALB/c → C3H) in der Mehrzahl der Fälle zu Langzeit-Überleben der Transplantate führte (Pearson et al., 1994). CD28-defiziente Mäuse sind jedoch prinzipiell zur Abstoßung von allogenen Haut- und Herztransplantaten in der Lage (Kawai et al., 1996). In mehreren Studien ließ sich die Abstoßung von Organtransplantaten durch alleinige Therapie mit CTLA-4-Ig nicht effektiv verhindern (Larsen et al., 1996; Hale et al., 1997). Larsen *et al.* schlugen als Erklärung für dieses Phänomen vor, dass durch CD40/CD40-Ligand (CD40L)-Interaktionen ein unabhängiges kostimulatorisches

Signal geliefert wird. In ihrem allogenen Transplantationsmodell (BALB/c → C3H) führte die alleinige Applikation von CTLA-4-Ig zwar zu einem verlängerten Überleben von heterotopen Herztransplantaten, aber nicht zu Langzeit-Transplantat-Überleben. Die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten wurde in diesen Experimenten durch die alleinige Gabe von CTLA-4-Ig nicht wesentlich beeinflusst. Im Gegensatz dazu resultierte die gleichzeitige Blockade von CD28-Kostimulation und CD40/CD40L-Interaktionen in dieser Studie sowohl im kardialen als auch im Haut-Transplantationsmodell in Langzeit-Überleben des transplantierten Gewebes (Larsen et al., 1996). Neuere Ergebnisse zeigten jedoch auch ein Versagen der Kombination von CTLA-4-Ig und anti-CD40L zur Therapie der Abstoßung allogener Hauttransplantate in der Maus. In der Studie von Li *et al.* wurde die gleiche Stammkombination sowie ein identisches Therapieschema wie von Larsen *et al.* verwendet (Li et al., 1999). Eine zweite Studie aus der Gruppe von Larsen zeigte unter Verwendung einer anderen Stammkombination (BALB/c → C57BL/6) nur einen geringen Effekt der Kombinationstherapie mit CTLA-4-Ig und anti-CD40L in der Verlängerung des Überlebens von Hauttransplantaten (Trambley et al., 1999).

Da in einigen Modellen auch bei gleichzeitiger Blockierung der CD40/CD40L-Interaktionen eine effektive Transplantatabstoßung erfolgt, lässt sich das Phänomen der Kostimulationsblockade-resistenten Transplantatabstoßung durch eine Redundanz von CD28 und CD40/CD40L-Kostimulation nicht oder zumindest nicht vollständig erklären. Sowohl bei alleiniger Blockade von CD28 als auch bei kombinierter Kostimulationsblockade sind die Ergebnisse u.a. von der gewählten Mausstamm-Kombination abhängig. Die voneinander abweichenden Ergebnisse von Larsen *et al.* (1996) und Li *et al.* (1999) zeigen jedoch, dass auch dies keine ausreichende Erklärung ist. Subtile Unterschiede wie die Lokalisation des entnommenen Hauttransplantats, die Herkunft des verwendeten CTLA-4-Ig sowie Unterschiede zwischen C3H Sub-Stämmen wurden als möglicherweise entscheidend für das Ergebnis diskutiert (Dharnidharka et al., 2000).

Die Unterschiede in der Fähigkeit zur Kostimulationsblockade-resistenten Transplantatabstoßung scheinen stärker von Empfänger- als vom verwendeten Donor-Stamm abhängig zu sein, da C57BL/6 Mäuse ähnlich resistent gegenüber einer Kostimulationsblockade nach Transplantation von BALB/c oder C3H/HeJ Hauttransplantaten sind, während C3H/HeJ Mäuse sowohl C57BL/6 als auch BALB/c Transplantate unter kombinierter Kostimulationsblockade (CTLA-4-Ig und anti-CD40L) akzeptieren (Dharnidharka et al., 2000). Nicht in diesen Erklärungsansatz passt die von Li et al. beobachtete Abstoßung von BALB/c Hauttransplantaten durch C3H/He Empfänger unter kombinierter Kostimulationsblockade. Williams *et al.* aus der Gruppe von Larsen versuchten, durch Vergleich von C57BL/6 und C3H/HeJ Mäusen in ihrem Hauttransplantationsmodell mit kombinierter Kostimulationsblockade Mechanismen zu finden, welche die vom Empfänger-Stamm abhängigen Unterschiede in den Transplantationsergebnissen erklären. Durch Verwendung von kongenen Mausstämmen konnten sie zeigen, dass die Unterschiede unabhängig von dem H-2-Phänotyp des Empfängers sind. Sie ließen sich ebenfalls nicht durch unterschiedliche Vorläufer-Frequenzen von alloreaktiven T-Zellen in den verglichenen Mausstämmen erklären. Deutlich unterschiedlich in C57BL/6 und C3H/HeJ Mäusen war dagegen

die Fähigkeit von CD8⁺ T-Zellen, bei kombinierter Kostimulationsblockade durch allogene Hauttransplantation aktiviert zu werden. Nach allogener Hauttransplantation mit kombinierter Kostimulationsblockade waren Milzzellen von C57BL/6, nicht aber von C3H/HeJ Empfängern zu einer allospezifischen zytolytischen Reaktion und zur IFN γ Produktion in der Lage. Knochenmarkschimären aus letal bestrahlten C3H.SW (C3H, H-2^b-kongenen) Mäusen, die C57BL/6 Knochenmarkszellen erhalten haben, zeigen ebenfalls den resistenteren Phänotyp von C57BL/6 Mäusen, so dass es wahrscheinlich erscheint, dass die genetischen Unterschiede zwischen den beiden Stämmen hämatopoetische Zellen betreffen. Eine vorläufige Genkopplungs-Analyse schlug vor, dass mehrere Loci einen kumulativen Effekt auf die Kostimulationsblockade-Resistenz haben, dabei konnten die für CD40, CD40L, CD28, CD80 und CD86 kodierenden Gene ausgeschlossen werden (Williams et al., 2000). Dies zeigt, dass die Kostimulationsblockade-Resistenz in C57BL/6 Mäusen nicht einfach durch einen Polymorphismus der Zielmoleküle der Therapie oder ihrer Liganden zu erklären ist. Weitere Kandidaten-Moleküle wie ICAM-1, 4-1BB, 4-1BB-Ligand, Fas, Fas-Ligand, TRANCE, IL-2, IL-15, IL-2R und IL-15R konnten auf diese Weise ebenfalls ausgeschlossen werden (Williams et al., 2000).

Die Ergebnisse von Szot *et al.* zeigen, dass das Immunsystem von CD28-defizienten Mäusen sich in seiner Kostimulationsabhängigkeit von Wildtyp-Mäusen unterscheidet. CTLA-4-Ig-Therapie führte in Wildtyp-Empfängern (C57BL/6) zu Langzeit-Überleben von NOD Herztransplantaten, wohingegen CD28^{-/-} Empfänger diese Transplantate im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Empfängern nicht signifikant verzögert abstießen. Da auch CTLA-4-Ig-Therapie nicht zu Transplantat-Überleben in CD28-defizienten Empfängern führte, scheint dies nicht durch zusätzliche aktivierende Rezeptoren für B-7-Moleküle zu erklären zu sein. Der Unterschied könnte darin begründet sein, dass in CD28-defizienten Mäusen dieses Molekül bereits während der T-Zell-Entwicklung im Thymus fehlt und dadurch die Bedingungen für Positiv- und Negativ-Selektion grundlegend verändert sind. Dies verdeutlicht, dass sich die Ergebnisse der Transplantation unter Kostimulationsblockade und -defizienz nicht direkt vergleichen lassen.

Yamada *et al.* verwendeten BALB/c-Mäuse als Empfänger von Herztransplantaten, und die ausgeprägten Unterschiede im Überleben von C57BL/6 Herzen in BALB/c CD28^{-/-} Empfängern im Vergleich zu BALB/c Herzen in C57BL/6 CD28^{-/-} Empfängern verdeutlichen nochmals den entscheidenden Einfluss der Stammkombination auf die Ergebnisse. Interessanterweise ließ sich in ihrem Modell die Überlebenszeit von allogenen Herztransplantaten in CD28^{-/-} Empfängern durch B7-2-Blockade weiter verlängern, während B7-1-Blockade im Vergleich zu unbehandelten CD28^{-/-}-Empfängern zu einer beschleunigten Abstoßung führte. Dies deutet darauf hin, dass *in vivo* B7-1 präferentiell ein inhibitorisches Signal über CTLA-4 liefert, dessen Blockade die Abstoßung beschleunigt. B7-2 dagegen liefert ein aktivierendes Signal, dessen Blockade in CD28-defizienten Empfängern zu einer weiteren Verlängerung des Transplantat-Überlebens führt. Es scheint also ein weiterer, bisher unbekannter, aktivierender Rezeptor für B7-2 zu existieren.

Tabelle 5.1: Ergebnisse in murinen Herztransplantationsmodellen

Referenz	Spender → Empfänger	Therapie	Mittlere Überlebenszeit
Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe	BALB/c → C57BL/6 CD28 ^{-/-}	keine	10,7 Tage (Wildtyp-Kontrolle: 7,7 Tage)
	(C57BL/6xBALB/c) _{F1} → C57BL/6 CD28 ^{-/-}	keine	> 100 Tage (Wildtyp-Kontrolle: 9,5 Tage)
Szot et al., 2000	NOD → C57BL/6 CD28 ^{-/-}	keine	9 Tage (Wildtyp-Kontrolle: 8 Tage)
	NOD → C57BL/6 WT	CTLA-4-Ig 50 µg Tag 0,2,4,6,8,10,12,14	> 100 Tage
	NOD → C57BL/6 CD28 ^{-/-}	CTLA-4-Ig 50 µg Tag 0,2,4,6,8,10,12,14	9 Tage
	NOD → C57BL/6 B7-1 ^{-/-}	keine	> 100 Tage (Wildtyp-Kontrolle: 8 Tage)
Yamada et al., 2001	C57BL/6 → BALB/c CD28 ^{-/-}	keine	38,5 Tage (Wildtyp-Kontrolle: 9 Tage)
	C57BL/6 → BALB/c CD28 ^{-/-}	Anti-B7-1 Tag 0,2,4,6	12,8 Tage
	C57BL/6 → BALB/c CD28 ^{-/-}	Anti-B7-2 einmalig am Tag 0	> 79,3 Tage
	C57BL/6 → BALB/c CD28 ^{-/-}	Anti-B7-2 Tag 0,2,4,6	> 88,8 Tage
	C57BL/6 → BALB/c WT	Anti-B7-2 Tag 0,2,4,6	19,3 Tage
Pearson et al., 1994	BALB/c → C3H/He	CTLA-4-Ig 50 µg Tag 0,2,4,6,8,10,12	> 100 Tage (Kontroll-Ig: 12 Tage)
Larsen et al., 1996	BALB/c → C3H	CTLA-4-Ig 200 µg Tag 0,2,4,6	50 Tage (unbehandelte Kontrolle: 12 Tage)
	BALB/c → C3H	CTLA-4-Ig 200 µg Tag 0,2,4,6 Anti-CD40L-AK 250 µg Tag 0,2,4	> 70 Tage
Zheng et al., 1997	BALB/c → Sv129	CTLA-4-Ig 200 µg einmalig an Tag 2	> 90 Tage (unbehandelte Kontrolle: 8,6 Tage)
	BALB/c B7-1 ^{-/-} → Sv129 B7-1 ^{-/-}	Anti-B7-2 200 µg einmalig an Tag 2	> 100 Tage (unbehandelte Kontrolle: 9,8 Tage)

Tabelle 5.1: Ergebnisse in murinen Herztransplantationsmodellen (Fortsetzung)

Seino et al., 2001	BALB/c → C57BL/6	Anti-B7-1 und anti-B7-2 je 50 µg täglich Tag 0-4	> 80 Tage (unbehandelte Kontrolle: nicht durchgeführt)
Li et al., 1998	BALB/c → C3H/He	CTLA-4-Ig 200 µg Tag 0,2,4,6 Anti- CD40L 250 µg Tag 0,2,4	> 100 Tage
Zhou et al., 2000	C3H → BALB/c	CTLA-4-Ig 50 µg Tag 0,2,4,6,8,10,12,14	> 100 Tage (unbehandelte Kontrolle: 8 Tage)

Tabelle 5.2: Ergebnisse in murinen Hauttransplantationsmodellen

Referenz	Spender → Empfänger	Therapie	Mittlere Überlebenszeit
Pearson et al., 1994	BALB/c → C3H/He	CTLA-4-Ig 50 µg Tag 0,2,4,6,8,10,12	11 Tage (unbehandelte Kontrolle: 10 Tage)
Kawai et al., 1996	BALB/c → C57BL/6 CD28 ^{-/-}	keine	9-13 Tage (Wildtyp- Kontrolle: 8-11 Tage)
Larsen et al., 1996	BALB/c → C3H	CTLA-4-Ig 200 µg Tag 0,2,4,6	12 Tage (unbehandelte Kontrolle: 12 Tage)
	BALB/c → C3H	CTLA-4-Ig 200 µg s.o. Anti-CD40L 250 µg Tag 0,2,4	> 50 Tage
Hale et al., 1997	C3H → B6AF1 (MHC- I disparat)	CTLA-4-Ig 100 µg Tag 0,2,4,6,8,10,12	23 Tage (Kontroll-Ig: 12 Tage)
	AKR → C57BL/6 (MHC-I und -II disparat)	CTLA-4-Ig 100 µg s.o.	15 Tage (Kontroll-Ig: 10 Tage)
Li et al., 1999	BALB/c → C3H/He	CTLA-4-Ig 200 µg Tag 0,2,4,6 Anti- CD40L 250 µg Tag 0,2,4	15 Tage (unbehandelte Kontrolle: 9 Tage)
Trambley et al., 1999	BALB/c → C57BL/6	CTLA-4-Ig 500 µg und Anti-CD40L 500 µg Tag 0,2,4,6	20 Tage (unbehandelte Kontrolle: 10 Tage)

Um die Mechanismen der Transplantatabstoßung in Abwesenheit von Kostimulation zu untersuchen, wurde für unsere Transplantationsexperimente eine Stammkombination ausgewählt (BALB/c → C57BL/6), die sich als sehr resistent gegenüber einer Kostimulationsblockade erwiesen hat. In Übereinstimmung mit den oben erläuterten Ergebnissen zeigten auf C57BL/6 rückgekreuzte, CD28-defiziente Mäuse den für C57BL/6 Mäuse typischen resistenteren Phänotyp und stießen allogene Herztransplantate im Vergleich zu Wildtyp-Empfängern akut ab. Darüber hinaus konnten wir jedoch zeigen, dass semiallogene Transplantate von CD28-defizienten Empfängern langfristig akzeptiert wurden. Dies deutet auf einen bisher unbekanntem Mechanismus der Transplantatabstoßung in Abwesenheit von Kostimulation hin. In unserem Modell wurde Langzeit-Transplantat-Überleben nicht durch die Blockade von weiteren Kostimulationsmolekülen erreicht, sondern durch die Einführung von Selbst-Molekülen verbunden mit einer Reduktion von Fremd-MHC auf den Transplantatzellen. Durch die durchflußzytometrische Analyse des zellulären Infiltrats konnten NK1.1 positive Zellen in allogenen Transplantaten nachgewiesen werden; und die Depletion von NK1.1 positiven Zellen führte zu einem deutlich verlängerten Überleben von allogenen Herzen in CD28-defizienten Empfängern. Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen daher eine Rolle von NK1.1 exprimierenden Zellen in der Transplantatabstoßung in Abwesenheit von Kostimulation und schlagen damit einen neuen Mechanismus zur Erklärung des Phänomens der Kostimulationsblockade-resistenten Transplantatabstoßung vor.

5.2 KOSTIMULATIONSABHÄNGIGKEIT VON CD8⁺ T-ZELLEN

In dem in dieser Arbeit verwendeten Modell der heterotopen Herztransplantation waren CD28^{-/-} Mäuse in Übereinstimmung mit anderen in CD28^{-/-} Mäusen und unter CTLA-4-Ig-Behandlung gewonnenen Ergebnissen (siehe Tabelle 5.1) prinzipiell zur Abstoßung von allogenen Herztransplantaten in der Lage. Die immunhistochemischen und durchflußzytometrischen Analysen zeigten eine deutliche Reduktion der Infiltration von CD4⁺ T-Zellen in das Transplantat in CD28-defizienten Empfängern, während die Infiltration von CD8⁺ T-Zellen wenig beeinträchtigt wurde. Dies deutet darauf hin, dass CD4⁺ T-Zellen stärker von einer Kostimulation durch CD28 abhängig sind als CD8⁺ T-Zellen.

Die Funktion von Kostimulation in der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen ist nicht eindeutig geklärt. Zahlreiche Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* weisen darauf hin, dass sich CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen in ihren Bedürfnissen der Kostimulation für eine effektive Aktivierung grundlegend unterscheiden. In verschiedenen Transplantationsmodellen mit CD28-, CD40L- oder kombinierter Kostimulationsblockade konnte durch Verwendung von CD8^{-/-}-Empfängern oder durch die Depletion von CD8-positiven T-Zellen eine deutliche Verbesserung des Transplantat-Überlebens oder sogar Toleranz erreicht werden (Trambley et al., 1999; Newell et al., 1999; Honey et al., 1999). Es scheint also, dass durch die Kostimulationsblockade eine CD8-positive Zellpopulation nicht ausreichend inhibiert wird.

In vitro zeigten Harding und Allison, dass die Induktion einer zytotoxischen Reaktion in der Abwesenheit von exogen zugegebenem IL-2 von einer Kostimulation über CD28 abhängig ist. Sowohl Gesamt-T-Zellen als auch isolierte CD8⁺ T-Zellen differenzierten bei Stimulation mit B7-transfizierten, aber nicht mit untransfizierten MHC-I-disparaten P815 Zellen zu zytotoxischen T-Zellen aus (Harding and Allison, 1993).

Die Notwendigkeit einer Kostimulation zur Induktion von zytotoxischen antiviralen Reaktionen ist unterschiedlich und hängt vom verwendeten Virus ab (zur Übersicht siehe Whitmire and Ahmed, 2000). CD28-defiziente oder CTLA-4-Ig behandelte Mäuse zeigen eine normale zytotoxische Reaktion nach LCMV-Infektion und sind in der Lage, diese effektiv zu bekämpfen (Shahinian et al., 1993; Tan et al., 1999). Dies unterstützt die Annahme, dass CD8⁺ T-Zellen für eine effektive Aktivierung zumindest in bestimmten Situationen nicht von einer Kostimulation durch CD28 abhängig sind. Dagegen sind B7/CD28-Interaktionen für die Generierung einer CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen VSV und Vacciniaviren notwendig, wie in Experimenten mit CD28-defizienten sowie B7-1/2-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte (Shahinian et al., 1993; Kundig et al., 1996; zur Übersicht: McAdam et al., 2000). Auch die Ausbildung einer zytotoxischen Reaktion gegen den H₁N₁-Subtyp des Influenzavirus ist B7-1-abhängig. Im Gegensatz dazu erfordert eine CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen den H₂N₂-Subtyp keine B7-Kostimulation. Die CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen zwei verschiedene Subtypen eines Virus kann also entweder abhängig oder unabhängig von einer B7-Kostimulation sein. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Tatsache, dass der H₂N₂-Subtyp im Gegensatz zum H₁N₁-Subtyp direkt eine Aktivierung von APZ induziert (Wu and Liu, 1994).

In verschiedenen Experimenten wurde eine wichtige Rolle der Aktivierung von APZ für die Stimulation von zytotoxischen T-Zellen gezeigt. Es wird angenommen, dass die B7/CD28-Interaktion in der Generierung von zytotoxischen Reaktionen eine indirekte Rolle spielt: CD28-Kostimulation führt über eine Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen zu einer Hochregulation des CD40L (Klaus et al., 1994). Dies resultiert in einer Aktivierung von APZ über CD40/CD40L-Interaktion, wodurch diese in die Lage versetzt werden, über nicht genau bekannte Mechanismen CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren (zur Übersicht siehe McAdam et al., 1998). Wenn ein Virus (wie der H₂N₂-Subtyp des Vacciniavirus) also direkt zu einer Aktivierung von APZ führt, so kann dadurch möglicherweise die Aktivierung über CD28 und CD40/CD40L ersetzt werden. Die Tatsache, dass CD40L^{-/-} und CD40^{-/-} Mäuse eine starke antivirale Antwort bei Infektion mit LCMV, VSV oder MHV-68 (Muriner Hepatitis-Virus) mit normalen Anzahlen von zytotoxischen T-Zellen generieren, zeigt, dass CD8⁺ T-Zellen nicht in jeder Situation von einer direkten oder indirekten Stimulation über CD40/CD40L-Interaktionen abhängig sind. Es ist anzunehmen, dass der oben beschriebene Weg der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen auch in der Transplantatabstoßung eine Rolle spielt. Auch im Transplantationsmodell mit kombinierter Kostimulationsblockade jedoch zeigt sich eine anscheinend Blockade-resistente Population von CD8⁺ T-Zellen (Trambley et al., 1999).

Für die in den verschiedenen Transplantationsmodellen erhobene Beobachtung, dass eine Kostimulation durch sowohl B7/CD28 als auch CD40/CD40L für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen nicht notwendig ist, gibt es prinzipiell zwei mögliche Erklärungen: a) CD8⁺ T-Zellen in der Situation einer allogenen Transplantation benötigen keinerlei Kostimulation, und b) andere kostimulatorische Moleküle sind für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen wichtiger als CD28 und CD40.

Für die erstere Möglichkeit sprechen neuere *in vitro* Ergebnisse aus der Gruppe von Frelinger, die zeigen, dass naive CD8⁺ T-Zellen allein durch MHC-Tetramere ohne die Anwesenheit von jeglichen anderen Molekülen aktiviert werden können. In den durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass isolierte naive CD8⁺ T-Zellen aus TZR-transgenen Mäusen durch die *in vitro* Stimulation mit den entsprechenden Tetrameren nicht nur zur Proliferation und Expression von Aktivierungsmarkern, sondern ebenso zur Ausübung von Effektorfunktionen (Zytokinproduktion und Zytotoxizität) angeregt wurden. Eine Kostimulation der isolierten CD8⁺ T-Zellen durch kontaminierende APZ wurde durch Isolierung von Einzelzellen ausgeschlossen. Im Gegensatz zur Stimulation mit anti-CD3-AK führte die Zugabe von anti-CD28-AK zur Kultur bei der Stimulation mit Tetrameren nicht zu einer weiteren Zunahme der Proliferation (Wang et al., 2000). Im Vergleich zur T-Zell-Aktivierung mit anti-CD3-AK stellt die Aktivierung durch Tetramere den wohl physiologischeren Stimulus dar. Daher ist denkbar, dass die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen bei der allogenen Transplantation sich eher so verhält, wie dies die durch *in vitro* Stimulation mit Tetrameren gewonnenen Ergebnisse vermuten lassen und ebenso wie diese Kostimulations-unabhängig ist.

Auch dafür, dass andere Kostimulationsmoleküle für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen von größerer Bedeutung sind als CD28 und CD40, sprechen einige Befunde, und es gibt verschiedene auf CD8⁺ T-Zellen exprimierte Moleküle, die hierfür in Frage kommen. So ist beispielsweise die Kostimulation über 4-1BB (Kwon and Weissman, 1989; Pollok et al., 1993) präferenziell für CD8⁺ T-Zellen wichtiger als für CD4⁺ T-Zellen. Dies zeigt sich sowohl *in vitro* bei Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit anti-CD3-mAK und agonistischem anti-4-1BB Antikörper (Shuford et al., 1997) als auch *in vivo* in der reduzierten CTL-Antwort von 4-1BB^{-/-}-Mäusen gegen LCMV und Influenza-Virus (Tan et al., 1999; DeBenedette et al., 1999). Ein weiteres Molekül, welches für die von einer Kostimulation via CD28 unabhängige Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen eine Rolle spielen könnte, ist ein aktivierender Rezeptor der CD94-NKG2-Familie. NKG2D ist sowohl auf NK-Zellen als auch auf CD8⁺ T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen vorhanden (Bauer et al., 1999). Beim Menschen ist gezeigt, dass Bindung des NKG2D-Rezeptors durch physiologische Liganden oder immobilisierten mAK die Aktivierung von CMV-spezifischen CD28^{-/-} CD8⁺ T-Zellen deutlich verstärken kann (Groh et al., 2001). Diese Experimente wurden jedoch mit CMV-spezifischen T-Zell-Klonen oder frisch isolierten CMV-spezifischen T-Zellen durchgeführt, so dass bisher noch keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob der NKG2D-Rezeptor auch in der Aktivierung von naiven T-Zellen eine Rolle spielt. Ein interessanter Kandidat ist auch das zur TNF-Superfamilie gehörige LIGHT (Mauri et al., 1998), da die

Abwesenheit von LIGHT zu einer verminderten zytotoxischen Reaktion von CD8⁺ T-Zellen führt (Stefanie Scheu, persönliche Mitteilung).

Auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell der Transplantation von allogenen Herzen in CD28-defiziente Empfänger wäre vorstellbar, dass CD8⁺ T-Zellen über andere Kostimulationsmoleküle als CD28 aktiviert werden. Meiner Ansicht nach reicht diese Erklärung allein jedoch für die beobachteten Befunde nicht aus. So ließe sich durch diese Argumentation zwar erklären, warum CD28-defiziente Mäuse zur Transplantatabstoßung in der Lage sind. Eine effektive Kostimulation durch andere Moleküle als CD28 sollte aber auch zu einer Abstoßung von semiallogenen Transplantaten führen. Für das beobachtete Langzeit-Überleben von semiallogenen Transplantaten in CD28 defizienten Empfängern scheint dieser Ansatz daher keine hinreichende Erklärung zu bieten.

In Analogie zu der oben beschriebenen Hypothese, dass für die Generierung einer antiviralen CD8-Antwort dann keine CD28-Kostimulation notwendig ist, wenn ein Virus direkt zu einer Stimulation von APZ führt, ist auch in der Transplantatabstoßung denkbar, dass die Kostimulationsabhängigkeit dadurch umgangen werden könnte, dass T-Helfer-Zell-unabhängige Mechanismen zu einer Aktivierung von APZ, und darüber von CD8⁺ T-Zellen, führen.

5.3 NK-ZELLEN IN DER TRANSPLANTATABSTOßUNG

Die Ergebnisse meiner Arbeit liefern mehrere Hinweise darauf, dass NK-Zellen eine wichtige Rolle in der Abstoßung von allogenen Herztransplantaten spielen. Zum einen kann postuliert werden, dass sich das Langzeit-Überleben von semiallogenen Transplantaten in CD28-defizienten Empfängern durch eine Interaktion von Selbst-MHC-I-Molekülen mit inhibitorischen Rezeptoren erklären lässt (zur Erläuterung siehe 5.4). Prototypische Zellen, die solche MHC-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren besitzen, sind NK-Zellen. Darüber hinaus konnten NK-Zellen in allogenen Transplantaten nachgewiesen und das Überleben allogener Transplantate in CD28-defizienten Empfängern durch Depletion NK1.1 positiver Zellen deutlich verlängert werden. Vor der Diskussion dieser Ergebnisse soll ein Überblick über die bisherigen Erkenntnisse zur Funktion von NK-Zellen in der Transplantation gegeben werden.

In der Knochenmarktransplantation ist eine Rolle natürlicher Killerzellen allgemein bekannt (zur Übersicht: Yu et al., 1992; Lanier, 1995). Sie zeigt sich in tierexperimentellen Modellen z.B. in der Abstoßung von β_2m -defizienten, genetisch MHC-identischen Transplantaten (Liao et al., 1991; Bix et al., 1991) und in der bei Knochenmarktransplantationen beobachteten Hybridresistenz (Bennett, 1987). Beim Menschen wurde vorgeschlagen, dass die Abstoßung allogener Knochenmarkstransplantate durch nicht immunsuppressiv vorbehandelte Patienten mit schweren kombinierten Immundefizienzen (SCID) ebenfalls durch NK-Zell-Aktivität zu erklären ist (O'Reilly et al., 1986). In der Abstoßung von soliden Organtransplantaten dagegen wird eine

mögliche Rolle von natürlichen Killerzellen kontrovers diskutiert. Athymische und daher T-Zell-defiziente Mäuse ebenso wie SCID- und Rag^{-/-}-Mäuse, die keine T- und B-Zellen, aber intakte NK-Zellen besitzen, sind nicht zu einer Abstoßung allogener solider Organtransplantate in der Lage (Bolton et al., 1989; Shelton et al., 1992; Manning et al., 1997; Pietra et al., 2000). NK-Zellen allein in Abwesenheit von T-Zellen reichen also zu einer Abstoßung von allogenen soliden Organtransplantaten sicher nicht aus. Dies kann aber keine Antwort auf die Frage geben, ob sie im Zusammenspiel mit T-Zellen eine Funktion in der Abstoßung solider Organtransplantate besitzen.

Bei der Depletion natürlicher Killerzellen durch Administration eines polyklonalen Kaninchen-Serums (Asialo-GM1-Antiserum) beobachteten Heidecke *et al.* in einem heterotopen Herztransplantationsmodell in der Ratte eine nur unwesentliche Verlängerung des Transplantat-Überlebens und folgerten daraus, dass NK-Zellen keine entscheidende Rolle in der Abstoßung von Herztransplantaten spielen (Heidecke et al., 1985). Zu dieser Zeit waren die Mechanismen der Aktivierung von natürlichen Killerzellen durch "Missing Self" noch unbekannt, und interessanterweise verwendeten die Autoren in dieser Studie (LEW/BN)F1 Ratten als Spender und LEW-Ratten als Empfänger - eine Situation also, in der Selbst-MHC auf dem Transplantat vorhanden ist und man daher nach dem heutigen Kenntnisstand möglicherweise keine Aktivierung von natürlichen Killerzellen erwarten würde. Eine neuere Studie von Martin Zijlstra *et al.* kam jedoch ebenfalls zu dem Schluss, dass NK-Zellen keine wesentliche Rolle in der Abstoßung solider Organtransplantate spielen (Zijlstra et al., 1992). Hier beschreiben die Autoren in einem murinen Modell, dass MHC-identische $\beta_2m^{-/-}$ Hauttransplantate durch $\beta_2m^{+/-}$ -Mäuse ebenso akzeptiert werden wie parentale Transplantate aus 129-Mäusen in (129/B6)F1-Empfängern - die zwei klassischen Situationen, in denen NK-Zell-Aktivität in der Abstoßung von Knochenmarkstransplantaten beobachtet wird. Weiterhin verglichen Zijlstra *et al.* die Suszeptibilität von hämatopoetischen (T-Zell-Blasten) und nicht hämatopoetischen (embryonale Fibroblasten) $\beta_2m^{-/-}$ Zielzellen gegenüber einer Lyse durch natürliche Killerzellen *in vitro*. Dabei zeigten hämatopoetische Zellen das klassische Muster der NK-Suszeptibilität durch "Missing Self", d.h. $\beta_2m^{-/-}$, aber nicht $\beta_2m^{+/+}$ -Zellen wurden von NK-Zellen lysiert. Bei nicht hämatopoetischen Zellen dagegen zeigte sich kein Unterschied zwischen $\beta_2m^{-/-}$ - und $\beta_2m^{+/+}$ -Zellen in der Lyse durch NK-Zellen, außerdem ließ sich die geringe beobachtete Lyse nicht durch Depletion NK1.1 positiver Zellen verhindern. Diese *in vitro* Ergebnisse zeigen, dass zwischen hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen ein grundsätzlicher Unterschied in der Fähigkeit, natürliche Killerzellen zu aktivieren, besteht, und unterstützen daher zunächst die *in vivo* Ergebnisse, die dafür sprechen, dass NK-Zellen keine wesentliche Rolle in der Abstoßung von soliden Organtransplantaten spielen.

Einige Studien lieferten indirekte Hinweise auf eine Aktivierung von NK-Zellen durch allogene Herztransplantation. Soulillou und Vie führten NK-Assays mit Milzzellen von LEW-Ratten nach der Transplantation von (LEW/BN)F1-Herztransplantaten durch. Zum Zeitpunkt der Abstoßung

entnommene Milzzellen waren zu einer stärkeren Lyse von murinen NK-Zielzellen (L1210-Lymphoblasten) in der Lage als nach Sham-Operation gewonnene Zellen (Soulillou et al., 1983). Die Autoren folgerten daraus, dass die Herztransplantation zu einer Aktivierung von NK-Zellen führte. In dieser Studie wurden ebenso wie in der Studie von Heidecke *et al.* F1-Ratten als Spender verwendet. Nachdem die untersuchten NK-Zellen nicht aus dem Transplantat selbst, sondern aus der Milz isoliert wurden, erscheint es möglich, dass die NK-Zellen nicht direkt durch das Transplantat aktiviert wurden, sondern die beobachtete erhöhte Aktivität z.B. ein durch die Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen verändertes Zytokinmilieu widerspiegelt. Petterson *et al.* zeigten 1997, dass insbesondere bei der Verwendung einer bestimmten Stammkombination (Wistar Furth (WF) → BN) in allogenen Herztransplantaten in der Ratte durch immunhistochemische Färbung erhebliche Mengen an NKRP1-positiven NK-Zellen nachzuweisen waren. Die Autoren restimulierten die transplantierten Ratten durch i.p. Injektion von Donor-Milzzellen, gewannen 3 Tage später Zellen durch Peritoneallavage und untersuchten die Fähigkeit von Subpopulationen zur Lyse unterschiedlicher Zielzellen. Im Gegensatz zu der umgekehrten untersuchten Stammkombination (BN → WF) zeigten aus WF-transplantierten BN-Empfängern gewonnene CD5⁺ T-Zellen keinerlei zytolytische Aktivität, dagegen lysierten CD5⁻ NK-Zellen Zielzellen in einer NK-typischen Weise: Syngene Zellen wurden nicht lysiert, allogene WF-Zellen und YAC-1-Zellen wurden lysiert, und F1-Zellen zeigten eine erheblich geringere Suszeptibilität gegenüber der Lyse als vollallogene Zellen. Die Autoren folgerten aus ihren Ergebnissen, dass zumindest in bestimmten Stammkombinationen NK-Zellen eine wichtige Rolle in der Abstoßung solider Organtransplantate spielen können. Aufgrund der vorherrschenden Ansicht, dass NK-Zellen nur in der Abstoßung von Knochenmarks-, nicht aber von soliden Organtransplantaten eine Rolle spielen, schlugen sie vor, dass die Aktivierung von NK-Zellen bei der heterotopen Herztransplantation möglicherweise durch hämatopoetische "Passenger"-Leukozyten im Transplantat erfolgte (Petersson et al., 1997). Um diese Möglichkeit weiter zu untersuchen, könnte man Herztransplantate von letal bestrahlten Spender-Tieren oder von Knochenmarkschimären mit zum Empfänger syngemem Knochenmarkstransplantat verwenden. ACI Ratten stoßen Herztransplantate von Lewis Chimären mit ACI Knochenmark nicht ab (Gundlach et al., 1992). Es wäre interessant, zu sehen, ob sich dieses Ergebnis in der Stammkombination WF → BN reproduzieren und mit einer fehlenden Einwanderung und Aktivierung von NK-Zellen korrelieren lässt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Rolle natürlicher Killerzellen in der Abstoßung solider Organtransplantate bisher weder schlüssig nachgewiesen noch widerlegt war. Im murinen Modell war bisher eine Infiltration von NK-Zellen in solide Organtransplantate nicht gezeigt, was sich zum Teil dadurch erklären lässt, dass die derzeit kommerziell erhältlichen Antikörper zur Detektion von murinen NK-Zellen nicht für die Immunhistochemie verwendbar sind. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Transplantat infiltrierenden Zellen durch Aufreinigung und Durchflußzytometrie zeigt zum ersten Mal eindeutig, dass NK-Zellen in murine allogene Herztransplantate einwandern. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen weiterhin auch

funktionell eine Rolle von NK1.1-positiven Zellen in der Abstoßung allogener Herztransplantate, die in Abwesenheit von CD28-Kostimulation sichtbar wird.

5.4 SEMIALLOGENES TRANSPLANTAT: ANWESENHEIT VON SELBST-MHC VERSUS REDUKTION VON FREMD-MHC

Im Rahmen dieser Arbeit lieferte die Beobachtung, dass semiallogene Transplantate von CD28-defizienten Mäusen ohne immunsuppressive Therapie akzeptiert werden, einen Hinweis darauf, dass NK-Zellen eine Rolle in der Abstoßung von soliden Organtransplantaten spielen. Semiallogene Transplantate unterscheiden sich durch zwei grundsätzliche Aspekte von voll-allogenen Transplantaten, die von CD28-defizienten Empfängern nur gering verzögert abgestoßen werden.

- 1) Die Menge ihrer auf der Zell-Oberfläche vorhandenen Fremd-MHC-Moleküle ist um ca. 50 % reduziert (Hasenkrug et al., 1994).
- 2) Zusätzlich besitzen die Donor-Zellen auch Selbst-MHC-, d.h. mit MHC des Empfängers identische MHC-Moleküle.

Es stellt sich daher die Frage, welcher dieser Effekte für die Akzeptanz von semiallogenen Transplantaten durch CD28-defiziente Empfänger verantwortlich ist.

5.4.1 Bindung inhibitorischer Rezeptoren durch Selbst-MHC-Klasse-I-Moleküle des Allotyps H-2^b auf Transplantatzellen

Natürliche Killerzellen besitzen MHC-I-spezifische inhibitorische Rezeptoren, die Zellen, welche den entsprechenden Liganden exprimieren, vor NK-vermittelter Lyse schützen und eine Aktivierung der NK-Zellen verhindern (siehe 1.1.4). Über diese Rezeptoren erkennen NK-Zellen nicht nur, ob physiologische Mengen von MHC-I auf der Zelloberfläche vorhanden sind, sondern können auch zwischen verschiedenen Allotypen unterscheiden (siehe Tabelle 1.1). Die Spezifität von NK-Zellen wird unter anderem durch das komplexe Expressionsmuster von verschiedenen inhibitorischen NK-Rezeptoren bestimmt. NK-T-Zellen besitzen ebenfalls inhibitorische MHC-I-spezifische Rezeptoren (Ortaldo et al., 1998; Skold and Cardell, 2000).

Im Fall der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten semiallogenen Transplantation könnten Selbst-MHC-I-Moleküle auf den haploidentischen Transplantaten durch eine Interaktion mit inhibitorischen NK-Rezeptoren die Aktivierung von NK- und NK-T-Zellen verhindern. Nach dem bisherigen Kenntnisstand der Spezifitäten von murinen Ly-49-Molekülen ist Ly49C ein Rezeptor, der zur Inhibition von NK-Zellen durch Klasse-I-Moleküle des MHC-Typ H-2^b führen kann (siehe Tabelle 1.1). Obwohl auch eine Bindung von Molekülen des MHC-Typ H-2^d an Ly49C

gezeigt worden ist, sprechen die funktionellen Daten dafür, dass nur die Interaktion mit H-2^b-Molekülen relevant ist. Dies wird einer höheren Affinität des Ly49C-Rezeptors für H-2^b-Moleküle im Vergleich zu H-2^d-Molekülen zugeschrieben. Bereits 1989 wurde durch die Gruppe von Michael Bennett gezeigt, dass letal bestrahlte Empfänger-Mäuse unterschiedlichster MHC-Typen (H-2^b, H-2^{bxd}, H-2^{kxb} und H-2^k) nach Depletion einer Subpopulation von NK-Zellen durch den gegen Ly49C gerichteten monoklonalen Antikörper 5E6 nicht mehr in der Lage sind, Knochenmarkstransplantate des Allotyps H-2^d abzustößen, während dies keinen Einfluss auf die Abstoßung von H-2^b-Transplantaten in H-2^{bxd}, H-2^{kxb} und H-2^k Empfängern hatte (Sentman et al., 1989). Raziuddin *et al.* konnten die Ergebnisse von Sentman *et al.* bestätigen und erweitern, indem sie zusätzlich zeigten, dass die Fähigkeit von H-2^d- und H-2^{bxd}-Empfängern, H-2^b Knochenmark abzustößen, durch Behandlung mit anti-Ly49C sogar verstärkt wird. Depletion der Empfänger von Ly49G2⁺-Zellen führte zu entgegengesetzten Ergebnissen: Die Abstoßung von H-2^b Knochenmarkszellen durch H-2^d und H-2^{bxd}-Empfänger wurde durch Vorbehandlung mit diesem Antikörper inhibiert, demgegenüber war die Abstoßung von H-2^d Knochenmark durch H-2^b- und H-2^{bxd}-Empfänger unbeeinflusst (Raziuddin et al., 1996). Die Ly49C⁺ Subpopulation, welche durch H-2K^b und H-2D^b inhibiert werden kann, ist also für die Abstoßung von Knochenmarkszellen des H-2^d-Allotyps verantwortlich, denen H-2K^b und H-2D^b fehlt.

Diese Daten legen die Hypothese nahe, dass auch auf semiallogenen Herztransplantaten H-2D^b und H-2K^b-Moleküle über Ly49C zu einer Inhibition von NK- und NK-T-Zellen aus H-2^b-Mäusen führen könnten bzw. die Ly49C⁺ Zellpopulation in Abwesenheit dieser MHC-Moleküle aktiviert wird. Dies schließt selbstverständlich nicht aus, dass andere Subpopulationen ebenfalls in der Abwesenheit von Klasse-I-Molekülen des Allotyps H-2^b aktiviert werden könnten.

Die Interpretation, dass Langzeit-Überleben von semiallogenen Transplantaten in CD28-defizienten Empfängern ein Selbst-MHC-vermittelter Effekt ist, wird dadurch unterstützt, dass NK- und NK-T-Zellen (also Zellen, auf denen inhibitorische Rezeptoren zu erwarten sind) in allogene Herztransplantate einwandern und in semiallogenen in CD28-defiziente Mäuse transplantierten Herzen nur minimal nachgewiesen werden konnten. Auch wenn die Inhibition durch MHC-I-Moleküle charakteristisch für NK-Zellen ist, sind die verantwortlichen Rezeptoren auch auf NK-T-Zellen exprimiert, und eine Inhibition dieser Zellen durch MHC-I-Moleküle ist gezeigt (Ortaldo et al., 1998). Ein Transplantat schützender Effekt durch Selbst-MHC-I-Moleküle könnte daher sowohl über NK- als auch NK-T-Zellen oder beide Populationen zustande kommen.

Interessanterweise führt semiallogene Transplantation in CD28^{+/+}-Empfänger zu keiner Reduktion von NK- und NK-T-Zellen, auch wenn dies entsprechend der Hypothese, dass auf den Transplantatzellen vorhandenes Selbst-MHC-I die Aktivierung von Zellpopulationen mit inhibitorischen Rezeptoren hemmt, vielleicht zu erwarten wäre. Wie in Kapitel 1.1.5 erläutert, wird das Ergebnis der Interaktion einer NK-Zelle mit einer Zielzelle nicht allein durch inhibitorische Rezeptoren bestimmt, sondern durch ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren.

Ausserdem ist zu berücksichtigen, dass CD28 auf der Mehrzahl muriner NK-Zellen vorhanden ist. Die Abwesenheit dieses Rezeptors auf NK-Zellen CD28-defizienter Mäuse könnte das Gleichgewicht positiver und negativer Signale verändern. Daneben besitzen NK-Zellen auch Zytokin-Rezeptoren, so dass die Verminderung von durch T-Zellen produzierte Zytokine in Abwesenheit von CD28 einen Einfluss haben könnte, z.B. schien die Transkription des NK-Zell aktivierenden Zytokins IL-12 ebenso wie die IL-2-Transkription in CD28-defizienten Empfängern vermindert zu sein. CD28-Defizienz könnte also in NK-Zellen direkt und indirekt zu einer Verminderung der aktivierenden Signale führen, so dass Inhibition durch Selbst-MHC-I-spezifische Rezeptoren leichter über diese dominieren kann.

5.4.2 Bedeutung der Stärke des TZR-Signals für die Aktivierung von T-Zellen in An- und Abwesenheit von Kostimulation

Der zweite wesentliche Unterschied zwischen den durch CD28-defiziente Empfänger akzeptierten semiallogenen und den abgestoßenen vollallogenen Herztransplantaten besteht in der Reduktion der auf der Zelloberfläche vorhandenen Fremd-MHC-Moleküle. MHC-Moleküle sind kodominant und unterliegen einem Gen-Dosis-Effekt, d.h. ein nur auf einem Allel kodiertes MHC-Molekül wird in einer geringeren Menge auf der Zelloberfläche exprimiert als ein durch zwei Allele kodiertes Molekül (Hasenkrug et al., 1994). In dem verwendeten F1-Modell sind neben MHC-Molekülen auch Minor-Antigene ebenfalls nur auf einem Allel kodiert. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass eine Reduktion der Dichte fremder Minor-Antigene auf die Hälfte keinen wesentlichen Einfluss auf das Transplantat-Überleben hat, da selbst Transplantate, die bezüglich der Minor-Antigene vollkommen identisch mit dem Empfänger sind und sich nur in einem oder mehreren Major-Antigenen von diesem unterscheiden, d.h. MHC-transgene oder -kongene Transplantate, akut abgestoßen werden (Klein et al., 1976). Auch Proteine, die in Spender und Empfänger identisch sind, können alloantigen wirksam sein, da polymorphe Reste in der Peptidbindungsgrube der MHC-Moleküle die Selektion und Bindung von Peptiden stark beeinflussen; d.h. von dem gleichen Protein werden durch Fremd-MHC andere Peptide präsentiert als durch Selbst-MHC (Sherman and Chattopadhyay, 1993). Um einen Einfluss von Minor-Antigenen auch formal auszuschließen, könnten Experimente im F1-Transplantationsmodell in Zukunft mit kongenen Mäusen durchgeführt werden.

Die Dichte der Major-Histokompatibilitäts-Antigene verdient eine genauere Betrachtung in Bezug auf einen möglichen Einfluss auf das Überleben von semiallogenen im Vergleich zu vollallogenen Transplantaten in CD28-defizienten Empfängern. Es wäre möglich, dass die Reduktion des Fremd-MHC bei semiallogenen Transplantaten zu einer verringerten "Allo-Antigen-Last" führt, die nicht zu einer suffizienten Aktivierung von CD28-defizienten T-Zellen in der Lage ist. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, wenn man bedenkt, dass bereits extrem kleine Anzahlen von MHC-Peptid-Komplexen pro Zelle ausreichend für eine effektive T-Zell-Aktivierung sind. Eine Vielzahl von Studien hat die Menge an Peptid-MHC-Komplexen, die für die Aktivierung von

CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen notwendig sind, untersucht. Die minimal notwendige Anzahl, um Antigen-spezifische Proliferation und Lymphokinproduktion (Harding and Unanue, 1990) oder eine zytolytische Reaktion (Christinck et al., 1991) hervorzurufen, ist von unterschiedlichen Autoren mit ca. 100-400 Peptid-MHC-Komplexen pro APZ angegeben worden. Als Erklärung für diese extrem hohe Sensitivität von T-Zellen wird herangezogen, dass T-Zellen APZ geradezu „abzutasten“ scheinen und jeder MHC-Peptid-Komplex aufeinanderfolgend mit einer Vielzahl von TZR interagieren und diese aktivieren kann (Davis, 1995; Valitutti et al., 1995).

Zwei neuere Studien haben die Anzahl an MHC-II-Peptid-Komplexen auf den APZ durch radioaktive Methoden (Kimachi et al., 1997) oder MHC-Peptid-Komplex-spezifische Antikörper (Reay et al., 2000) gemessen. Kimachi *et al.* verwendeten verschiedenste Endpunkte wie Proliferation, Zytokinproduktion und Expression von Aktivierungsmarkern zur Bestimmung der T-Zell-Aktivierung. Nach ihren Beobachtungen erforderte die Erzeugung einer halbmaximalen proliferativen Reaktion von naiven CD4⁺ T-Zellen ca. 400 Peptid-MHC-II-Komplexe pro APZ, die maximale Proliferation wurde bei ca. 2000 Komplexen pro APZ erreicht. Naive T-Zellen benötigten ca. 1500 Peptid-MHC-Komplexe, um wesentliche Mengen an IL-2 zu produzieren, bereits ab einer Dichte von 100 Komplexen waren jedoch geringe Mengen IL-2 nachzuweisen. Diese Menge an Komplexen führte auch zu einer Blastentransformation von 50% der T-Zellen; zur Induktion von Aktivierungsmarkern auf 50% der T-Zellen waren 300-400 (CD25) bzw. 100 (CD69) Komplexe erforderlich. Reay *et al.* bestimmten 400-600 Peptid-MHC-II-Komplexe als die notwendige Anzahl zur Aktivierung von naiven T-Zellen gemessen an der IL-3-Produktion, sahen aber eine maximale Zytokinproduktion erst bei ca. 5000 Komplexen. Diese neueren Studien scheinen also die Ergebnisse der bisherigen Schätzungen zu bestätigen. Die in verschiedenen Studien erhaltenen minimalen Anzahlen an Peptid-MHC-I-Komplexen zum Hervorrufen einer zytotoxischen Antwort reichen von mehreren Tausend bis zu weniger als zehn Komplexen (Brower et al., 1994; Sykulev et al., 1995). In stärkerem Maße als bei CD4⁺-Antworten scheinen die notwendigen Anzahlen vom verwendeten Peptid abhängig zu sein. Sykulev *et al.* konnten bei Verwendung des sehr potenten L^d-präsentierten Peptids QL9 bereits bei durchschnittlich drei Peptid-MHC-Komplexen pro APZ eine halbmaximale zytolytische T-Zell-Antwort erreichen, ein anderes untersuchtes Peptid erforderte eine ca. 100fach höhere Konzentration von Komplexen für eine vergleichbare Reaktion (Sykulev et al., 1996). Insgesamt scheinen die für zytotoxische Reaktionen erforderlichen Anzahlen an MHC-Peptid-Komplexen zwar stärker zu schwanken, aber noch geringer zu sein als die für T-Helfer-Zell-Reaktionen notwendigen Mengen.

Vollallogene Transplantate besitzen ca. 10 000 – 100 000 fremde MHC-Moleküle pro Zelle. Bei einer Reduktion auf ca. 5 000 – 50 000 fremde MHC-Moleküle auf semiallogenen Transplantaten scheint daher die Anzahl der MHC-Peptid-Komplexe immer noch weit über der für die T-Zell-Aktivierung notwendigen zu liegen.

Auf der anderen Seite sollte auch diskutiert werden, dass die zur T-Zell-Aktivierung erforderlichen Anzahlen von Peptid-MHC-Komplexen in den bisher erwähnten Studien in der

Anwesenheit von CD28-Kostimulation bestimmt wurden. Beispielsweise sind die sowohl von Kimachi als auch von Reay verwendeten Stimulator-Zellen CH27 (eine B-Lymphom-Zelllinie) Zellen mit einer starken kostimulatorischen Aktivität (Williams and Unanue, 1991).

Es ist derzeit nicht geklärt, ob die Notwendigkeit einer CD28-Kostimulation durch hohe Antigen-dichte teilweise oder vollständig überwunden werden kann. In einigen *in vitro* Systemen wurde gezeigt, dass die zur Aktivierung von T-Zellen notwendige Anzahl von aktivierten TZR durch Kostimulation gesenkt werden kann (Cai and Sprent, 1996; Viola and Lanzavecchia, 1996; Teh and Teh, 1997; Itoh and Germain, 1997). Viola und Lanzavecchia zeigten z.B., dass *in vitro* die für die T-Zell-Aktivierung notwendige Anzahl gebundener TZR in Anwesenheit von CD28-Kostimulation lediglich ca. 1500 betrug, im Gegensatz zu einer Aktivierungsschwelle von ca. 8000 TZR in Abwesenheit von Kostimulation. Allerdings ist nicht klar, inwieweit diese Ergebnisse unter *in vivo* Bedingungen tatsächlich eine Rolle spielen, da viele Studien unphysiologische Stimuli verwendeten, z.B. TZR mit einer ungewöhnlich hohen Affinität (Cai and Sprent, 1996) oder sehr hohe Konzentrationen von antigenen Peptiden oder anti-CD3-Antikörpern. In einer neueren Studie von Chai *et al.*, in der verschiedene physiologische APZ als Stimulatorzellen und H-Y-spezifische CD8⁺ transgene T-Zellen als Effektorzellen verwendet wurden, war die Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen strikt Kostimulations-abhängig. Dies ließ sich nicht durch höhere Antigen-Dichte ausgleichen (Chai *et al.*, 1999). In den oben erwähnten Studien waren, mit Ausnahme von extrem hohen Stimuli, etwa ein bis zwei Zehnerpotenzen höhere Anzahlen von TZR-Stimuli notwendig, um in Abwesenheit von CD28-Kostimulation vergleichbar starke Antworten wie in deren Anwesenheit zu erhalten. Auch wenn es aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse durchaus möglich ist, dass die Antigen-Dichte in der Abwesenheit von Kostimulation eine größere Rolle spielt, erscheint es daher unwahrscheinlich, dass die Reduktion auf ca. 50 % im F1-Modell als Erklärung für das verlängerte Transplantat-Überleben in CD28^{-/-} Empfängern ausreicht.

Um diese Fragestellung weiter zu untersuchen, sollten Herzen der F1-Generation von MHC-I defizienten Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund (Perarnau *et al.*, 1999) und Wildtyp-BALB/c Mäusen in CD28-defiziente Empfänger transplantiert werden. Diese Transplantate entsprechen hinsichtlich ihrer Expression von Fremd-MHC-I und -II den in dieser Arbeit verwendeten semiallogenen Transplantaten, besaßen aber kein Selbst-MHC-I. Ist die Akzeptanz von semiallogenen Herzen durch verminderte „Allo-Antigen-Last“ zu erklären, so müssten solche Transplantate weiterhin akzeptiert werden; ist das Vorhandensein von Selbst-MHC-I entscheidend, so müssten sie abgestoßen werden.

5.5 IN VIVO DEPLETION NK1.1 POSITIVER ZELLEN

Als zweiter Ansatz zur Untersuchung einer Rolle von NK-Zellen in der Abstoßung von allogenen Herztransplantaten in der Abwesenheit von CD28-Kostimulation wurden in den Transplantat-

empfängern NK1.1 positive Zellen depletiert. Dies führte zu einem deutlich verlängerten Überleben allogener Herztransplantate in CD28-defizienten Empfängern.

5.5.1 In vivo Administration von anti-NK1.1 mAK führt nicht zur unspezifischen Immunsuppression

Grundsätzlich muss bei der Applikation von Antikörpern beachtet werden, dass Antikörper unspezifische immunsuppressive Effekte haben können. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht genau bekannt, wahrscheinlich hängt dieser Effekt zumindest teilweise damit zusammen, dass Antikörper an Fc-Rezeptoren binden können und dadurch Fc-Rezeptor tragende Zellen beeinflussen oder zu einer Sequestrierung und zum Abbau der Zellen führen können. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper PK136 scheint jedoch nicht zu solchen unspezifischen Effekten zu führen. Hierfür gibt es mehrere überzeugende Hinweise. Im Rahmen der durchgeführten Kontrollen zeigte sich, dass Applikation einer identischen Menge von murinem IgG zu keiner Verlängerung des Transplantat-Überlebens führte. Da immunsuppressive Effekte vom Ig-Subtyp und sogar von der Spezifität des Antikörpers abhängen können, ist ein noch stärkeres Argument darin zu sehen, dass Injektion von anti-NK1.1 in CD28-Wildtyp-Empfänger ebenfalls nicht zu einer Verlängerung des Transplantat-Überlebens führte.

Darüber hinaus ist der PK136-Antikörper in zahlreichen Depletionsexperimenten in mit dieser Studie vergleichbaren Dosierungen verwendet worden, um den Einfluss NK1.1 positiver Zellen auf *in vivo* Immunantworten zu untersuchen. In keinem Fall wurden unspezifische immunsuppressive Effekte beschrieben. Nilsson *et al.* zeigten, dass NK1.1 depletierte Mäuse zwar suszeptibler gegenüber der Entwicklung einer septischen Arthritis nach i.v. Injektion von *S. aureus* sind, aber erhöhte Antikörper-Titer nach Immunisierung mit Oxazolone zeigen, während die Fähigkeit phagozytärer Zellen aus dem peripheren Blut zur Phagozytose von Bakterien ebenso wie durch Oliven-Öl induzierte Entzündungsreaktion und DTH-Reaktion auf Oxazolone durch die Depletion unbeeinflusst blieben (Nilsson *et al.*, 1999). Wang *et al.* zeigten, dass NK1.1-Depletion durch den PK136-Antikörper nicht zur Veränderung des T_H1 - T_H2 -Gleichgewichtes in Kulturen führte und keinen Einfluss auf die OVA-spezifische IgG2a und IgE-Synthese hatte (Wang *et al.*, 1998). NK1.1-depletierte Mäuse waren sogar weniger suszeptibel gegenüber der Infektion durch Listerien und zeigten am Tag 5 nach Infektion geringere Mengen von Listerien in der Milz (Teixeira and Kaufmann, 1994). Zusammenfassend führte die Behandlung von Mäusen mit dem monoklonalen Antikörper PK136 in unterschiedlichen Modellen zu distinkten Ergebnissen. Insbesondere die Tatsache, dass PK136 behandelte Mäuse sogar kompetenter sind als unbehandelte Mäuse, eine Infektion mit Listerien abzuwehren, schließt einen unspezifischen immunsupprimierenden Effekt durch PK136 praktisch aus.

5.5.2 Spezifität der NK-Depletion durch anti-NK1.1

Der verwendete Antikörper anti-NK1.1 ist in der Literatur zur spezifischen Depletion von NK-Zellen beschrieben worden (Seaman et al., 1987). In einem Vergleich von drei unterschiedlichen Antikörpern zur Depletion von NK-Zellen (anti-NK1.1, anti-IL2R β und anti-AsialoGM1) erwies sich anti-NK1.1 als für die Depletion von NK-Zellen am spezifischsten und zeigte als einziger der drei Antikörper keinen Effekt auf zytotoxische T-Zellen (Ehl et al., 1996). Es ist jedoch bekannt, dass der NK-Zell-Marker NK1.1 nicht nur auf NK-Zellen exprimiert ist. Wie in 5.5.4 erläutert, ist die Expression von NK1.1 auch charakteristisch für NK-T-Zellen, so dass davon auszugehen ist, dass die Depletion mit anti-NK1.1 auch Auswirkungen auf diese Zellpopulation hat. Zumindest bei dem in dieser Arbeit verwendeten Depletionsschema scheinen auch NK-T-Zellen depletiert worden zu sein, da sich im Transplantat keine NK1.1⁺CD3⁺ bzw. DX5⁺CD3⁺ Zellen mehr nachweisen ließen. Nach den Untersuchungen von Seaman *et al.* und Ehl *et al.* scheint die *in vivo* Administration von anti-NK1.1 keinen Effekt auf konventionelle T-Zellen sowie auf B-Zellen zu haben. Effekte der anti-NK1.1-Gabe auf Makrophagen und Dendritische Zellen sind derzeit nicht bekannt.

5.5.3 Effekte von anti-NK1.1- und anti-Asialo-GM1-Depletion in einem murinen Hauttransplantationsmodell mit kombinierter Kostimulationsblockade

Interessanterweise beobachteten Trambley *et al.* in dem von ihnen verwendeten murinen Hauttransplantationsmodell (BALB/c \rightarrow C57BL/6, Kostimulationsblockade durch Gabe von CTLA-4-Ig und anti-CD40L) keine Verlängerung des Transplantat-Überlebens durch Depletion mit anti-NK1.1, wohl aber durch Depletion mit Asialo-GM1-Antiserum. Die Autoren interpretieren dieses Ergebnis dahingehend, dass nicht NK-Zellen, sondern eine andere Zellpopulation, die sich durch Asialo-GM1, aber nicht durch NK1.1 depletieren lässt, für den beobachteten Effekt verantwortlich ist (Trambley et al., 1999). Zwar sind die Ergebnisse in der Abstoßung von Hauttransplantaten nicht direkt mit den Ergebnissen zur Abstoßung von Herztransplantaten zu vergleichen, die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Rolle NK1.1 positiver Zellen in der Abstoßung solider Organtransplantate stellt jedoch die Interpretation von Trambley *et al.* meines Erachtens in Frage. Trambley *et al.* verwendeten ein Depletionsschema, das erst am Tag der Transplantation beginnt und gaben dann wöchentlich 200 μ g anti-NK1.1. In Vorversuchen konnte ich feststellen, dass effektive Depletion von DX5⁺CD3⁻ NK-Zellen durch anti-NK1.1 ca. 48 Stunden benötigt und habe daher die Depletion zwei Tage vor der Transplantation begonnen. Zusätzlich habe ich die Intervalle der Antikörper-Injektionen wesentlich kürzer gewählt. Trambley *et al.* verwendeten für die Depletion mit anti-NK1.1 und mit anti-Asialo-GM1 unterschiedliche Protokolle und gaben anti-Asialo-GM1 alle 4 Tage, anti-NK1.1 aber nur alle 7 Tage. Die vergleichsweise großen Abstände zwischen den einzelnen Injektionen von anti-NK1.1 begründen die Autoren damit, dass sie zeigen konnten, dass mit Hilfe dieses Therapieschemas eine effektive Depletion von NK-Zellen über mindestens 21 Tage aufrechterhalten werden konnte. Diese Untersuchungen wurden

jedoch in nicht-transplantierten Tieren durchgeführt. Ergebnisse von Vorversuchen im Rahmen meiner Arbeit zeigten bei nativen Tieren ebenfalls eine längere Wirksamkeit von anti-NK1.1, die Kontrolle der Depletion in herztransplantierten Mäusen zeigte jedoch bei längeren Abständen in einigen Fällen eine nicht ausreichend effektive Depletion. Die von Trambley *et al.* gefundenen unterschiedlichen Ergebnisse bei Verwendung von anti-Asialo-GM1 im Vergleich zu anti-NK1.1 sind möglicherweise dadurch zu erklären, dass nur das anti-Asialo-GM1-Depletionsschema zur effektiven Depletion von NK- (und NK-T-) Zellen führte. Zusammengenommen widersprechen die von Trambley *et al.* gewonnenen Ergebnisse daher den Resultaten meiner Untersuchungen keineswegs, sondern unterstützen sie, da sich in einem unterschiedlichen Modell durch Kostimulationsblockade in Kombination mit Depletion von NK- und NK-T-Zellen durch anti-Asialo-GM1 ebenfalls eine deutliche Verlängerung des Überlebens von Allotransplantaten erreichen ließ. Ob dieser Effekt durch NK-Zellen oder durch NK-T-Zellen vermittelt ist, sollte weiter untersucht werden.

5.5.4 NK-T-Zellen

NK-T-Zellen sind Lymphozyten, die Charakteristika mit einerseits NK-Zellen und andererseits T-Zellen gemeinsam haben (siehe Abbildung 5.1) In Mäusen werden NK-T-Zellen i.d.R. durch die Ko-Expression von NK1.1 und $\alpha\beta$ TZR definiert. Einige neuere Studien haben gezeigt, dass $\text{NK1.1}^+\alpha\beta\text{TZR}^+$ Zellen phänotypisch und funktionell heterogen sind und mehrere Subpopulationen unterschieden werden müssen. Diese Subpopulationen lassen sich durch ihre Expression von CD4 und CD8 ($\text{CD4}^+\text{CD8}^-$, $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ und doppelt negativ [DN]) und durch ihre TZR-Spezifitäten von einander abgrenzen (siehe Tabelle 5.3). Eine wesentliche Population von NK-T-Zellen ist CD1d-restringiert und besitzt eine invariante $\text{V}\alpha 14\text{J}\alpha 281$ TZR-Kette zusammen mit einer $\text{V}\beta 2$, -7 oder -8 TZR-Kette; diese Zellen werden als „klassische“ NK-T-Zellen oder präziser als $\text{V}\alpha 14$ -NK-T-Zellen bezeichnet.

In allogenen Herztransplantaten konnten durchflußzytometrisch NK1.1⁺CD3⁺ Zellen nachgewiesen werden. Es erscheint möglich, dass eine verringerte oder fehlende Aktivierung dieser Zellen eine Rolle für das verlängerte Überleben semiallogener Transplantate spielt. Auch das Ergebnis der Transplantation unter NK1.1-Depletion ist hiermit vereinbar. Es erfolgte bisher keine Charakterisierung der im Infiltrat nachgewiesenen NK-T-Zellen bezüglich ihrer Expression von CD4 und CD8 und ihres TZR-Repertoires, daher ist eine Zuordnung dieser Zellen zu den bekannten NK-Zell-Subpopulationen nicht möglich. Zwei wesentliche Subpopulationen von NK-T-Zellen, V α 14-NK-T-Zellen und CD8⁺ NK-T-Zellen, sollen kurz vorgestellt und ihre mögliche Bedeutung in der Transplantatabstoßung im Zusammenhang mit bisher veröffentlichten Ergebnissen diskutiert werden.

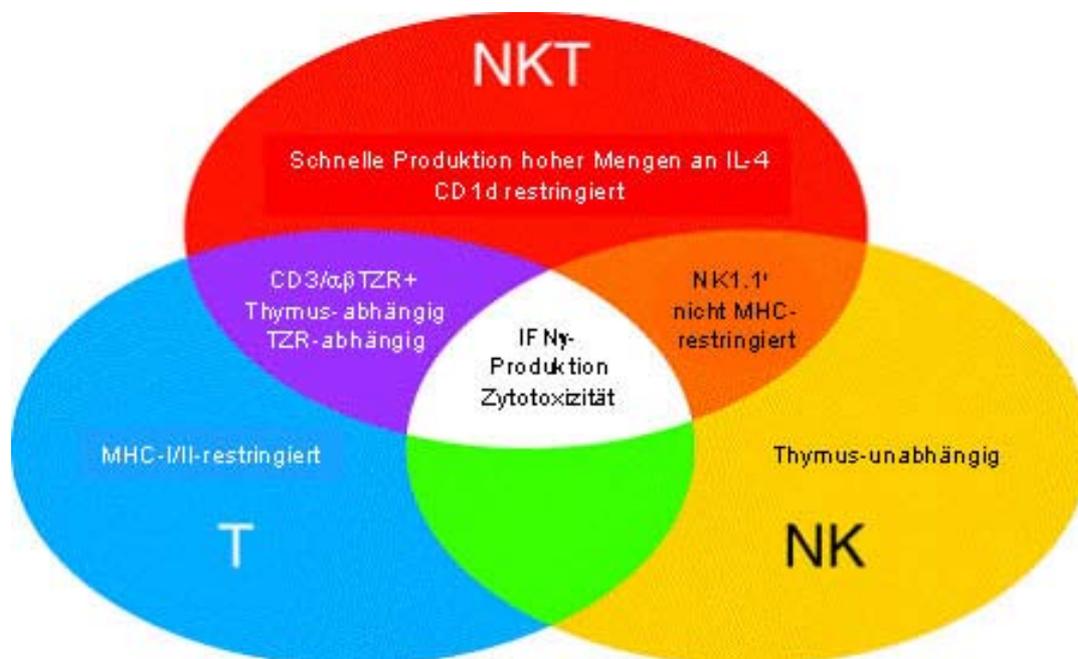


Abbildung 5.1: Charakteristische Eigenschaften von NK-, T-, und NK-T-Zellen.

Überlappende Eigenschaften von NK-T- und T-Zellen bzw. von NK- und T-Zellen sind in den durch Mischfarben gekennzeichneten Feldern (orange und violett), allen drei Zellpopulationen gemeinsame Eigenschaften im weißen Bereich dargestellt. Schnelle Produktion hoher Mengen an IL-4 und CD1d-Restriktion sind charakteristisch für V α 14-NK-T-Zellen, zur Erläuterung anderer NK-T-Zell-Populationen siehe Text (nach: Godfrey et al., 2000).

Tabelle 5.3: Zusammenstellung einiger Charakteristika von peripheren NK-T-Zell-Populationen aus C57BL/6-Mäusen (nach: Godfrey et al., 2000).

	Gesamt	CD4 ⁺	DN*	CD8 ⁺
Anteil V β 8 ⁺ Zellen	42 %	51 %	31 %	24 %
Anteil DX5 ⁺ Zellen	13 %	4 %	35 %	43 %
Anteil Ly49A ⁺ Zellen	40 %	20 %	50 %	45 %
CD1d-restringiert	ja/nein	ja	ja/nein	nein
Thymus-abhängig	ja/nein	ja	ja	nein
IL-4 (U/ml)**	300	200	50	2
IFN γ (ng/ml)**	0,2	0,3	0,1	0,8

* DN: Doppelt (CD4/CD8) negativ.

** Mittels ELISA gemessene Zytokin-Produktion nach 18-stündiger Kultur mit immobilisiertem anti-CD3-AK.

V α 14-NK-T-Zellen

V α 14-NK-T-Zellen stellen eine neue, sowohl von konventionellen T-Zellen als auch von NK-Zellen abzugrenzende Lymphozyten-Linie dar. Wie bereits erwähnt, sind sie durch die Expression einer invarianten α -Kette, die durch die Gensegmente V α 14 und J α 281 kodiert wird, in Kombination mit einigen wenigen β -Ketten, vorwiegend V β 8.2, gekennzeichnet. Dieser TZR erkennt ein Glykolipid-Antigen (α -Galaktosyl-Ceramid, α -Gal-Cer) oder parasitäre Glykophosphatidylinositole (GPI) in Assoziation mit einem monomorphen Klasse-Ib-Molekül, CD1d. Die Interaktion des V α 14-Rezeptors mit CD1d-Molekülen ist essentiell für die Entwicklung dieser Zellen. Wie konventionelle T-Zellen unterliegen V α 14-NK-T-Zellen einer Positiv-Selektion, wobei nicht eindeutig geklärt ist, ob diese ebenfalls im Thymus oder aber im Knochenmark stattfindet. Es existieren zwei V α 14-NK-T-Zell-defiziente Mausmodelle: Sowohl in J α 281^{-/-} als auch in CD1d^{-/-} Mäusen können sich V α 14-NK-T-Zellen nicht entwickeln. β ₂m-defiziente Mäuse besitzen, neben anderen Defekten, ebenfalls keine V α 14-NK-T-Zellen, da das CD1d-Molekül ohne die β ₂m-Kette nicht stabil ist. V α 14-NK-T-Zellen sind entweder CD4⁺ oder CD4⁻CD8⁺. Die physiologischen Funktionen von V α 14-NK-T-Zellen sind bisher nur unzureichend bekannt. V α 14-NK-T-Zellen können sowohl T_H1- als auch T_H2-Zytokine produzieren und besitzen darüber hinaus durch Perforin/ Granzyme B und Fas-Ligand vermittelte zytotoxische

Aktivität. Den Zellen wird eine Rolle in der IL-12-induzierten Anti-Tumor-Aktivität zugeschrieben (Cui et al., 1997). Da aktivierte V α 14-NK-T-Zellen große Mengen an sowohl IL-4 als auch IFN γ produzieren, wurde eine Rolle dieser Zellen in der T_H1/T_H2-Differenzierung vorgeschlagen. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit α -Gal-Cer, welches zu einer Aktivierung von V α 14-NK-T-Zellen führt, während der Immunisierung mit Ovalbumin die T_H2-Differenzierung und IgE-Produktion supprimiert. Eine gestörte Funktion von V α 14-NK-T-Zellen ist sowohl im Menschen als auch in Tiermodellen mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen assoziiert (zur Übersicht siehe Godfrey et al., 2000).

Bei der Transplantation ist für V α 14-NK-T-Zellen in zwei Modellen eine Funktion in der Induktion von Toleranz gezeigt. In V α 14-NK-T-defizienten Mäusen ließ sich, im Gegensatz zu Wildtyp-C57BL/6-Mäusen, durch anti-CD4-Behandlung keine Toleranz gegen Inselzell-Xenotransplantate aus der Ratte erzeugen. Die Toleranz ließ sich durch adoptiven Transfer von V α 14-NK-T-Zellen in V α 14-NK-T-defiziente Empfänger rekonstituieren (Ikehara et al., 2000). Ebenso ließ sich in V α 14-NK-T-defizienten Mäusen keine Toleranz gegenüber allogenen Herztransplantaten durch Kostimulationsblockade mit anti-LFA-1 und anti-ICAM-1 oder anti-B7-1 und anti-B7-2 erzielen, während Wildtyp-C57BL/6-Mäusen unter diesen Therapien allogene Herztransplantate akzeptierten (Seino et al., 2001). Auch in diesem Modell ließ sich die Akzeptanz in NK-T-defizienten Empfängern durch den Transfer von V α 14-NK-T-Zellen zumindest teilweise wiederherstellen. Dagegen führte der Transfer von Knochenmarkszellen aus IFN γ -defizienten Mäusen nicht zur Wiederherstellung der Toleranz. Dieses Ergebnis liefert einen indirekten Hinweis darauf, dass von V α 14-NK-T-Zellen produziertes IFN γ für die Induktion von Toleranz durch Kostimulationsblockade notwendig ist. V α 14-NK-T-Zellen scheinen keine Rolle als Effektorzellen in der Transplantatabstoßung zu spielen. V α 14-NK-T-defiziente Empfänger stoßen allogene Transplantate nicht verzögert ab, und V α 14-NK-T-tg Mäuse, die nur diese Zellen und praktisch keine konventionellen T-Zellen besitzen (Cui et al., 1997), akzeptieren Inselzell-Xenotransplantate ohne jegliche Therapie (Ikehara et al., 2000).

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen eine Rolle von NK1.1 exprimierenden Zellen in der Transplantatabstoßung, während V α 14-NK-T-Zellen eine Rolle in der Induktion von *Toleranz* besitzen. Es erscheint daher sehr unwahrscheinlich, dass das verlängerte Transplantat-Überleben durch NK1.1-Depletion in CD28-defizienten Empfängern durch die Depletion dieser klassischen NK-T-Zellen zu erklären ist. Um die Funktion von V α 14-NK-T-Zellen auch in dem in meiner Arbeit verwendeten Modell zu untersuchen, könnte man CD28/V α 14-NK-T doppelt defiziente Mäuse züchten und diesen allogene Herzen transplantieren. Noch interessanter wäre die Transplantation von semiallogenen Herzen in diese doppelt defizienten Mäuse, um zu testen, ob die Induktion von Akzeptanz auch in dieser Situation V α 14-NK-T-abhängig ist.

CD8⁺ NK-T-Zellen

Aus Milzen isolierte CD8⁺ NK-T-Zellen sind CD1d- und Thymus-unabhängig, exprimieren ein diverses TZR-Repertoire, und sezernieren nur wenig IL-4 (zur Übersicht siehe Godfrey et al., 2000). Dagegen produzieren diese Zellen nach *in vitro* Stimulation größere Mengen an IFN γ als die anderen Subpopulationen (siehe Tabelle 5.3). Die Entwicklung von CD8⁺NK1.1⁺ T-Zellen ist völlig unklar. Möglicherweise entstehen CD8⁺NK1.1⁺ T-Zellen nach Antigenkontakt in der Leber (Legendre et al., 1999). Im Gegensatz zu V α 14-NK-T-Zellen ist nicht bekannt, ob CD8⁺NK1.1⁺ T-Zellen eine eigene Linie darstellen. Die Ergebnisse von Assarsson *et al.* und Slifka *et al.* zeigen, dass konventionelle CD8⁺ T-Zellen durch *in vitro* Stimulation mit IL-2, IL-4 oder IL-15 oder *in vivo* Aktivierung durch Infektion mit Influenza-Virus (Assarsson et al., 2000) oder LCMV (Slifka et al., 2000) verschiedene NK-Marker, u.a. NK1.1, aquirieren können. CD8⁺NK1.1⁺ T-Zellen sind somit möglicherweise als aktivierte T-Zellen und nicht als eigene Entwicklungslinie anzusehen. In beiden Publikationen wird darauf hingewiesen, dass Ergebnisse von Experimenten mit NK1.1- oder Asialo-GM1-Depletion auch unter dem Gesichtspunkt betrachtet werden müssen, dass durch die Applikation der Antikörper aktivierte CD8⁺ T-Zellen, die „NK-Marker“ aquiriert haben, depletiert werden können. Im Zusammenhang mit der von Trambley *et al.* geforderten Rolle einer Population von Asialo-GM1⁺CD8⁺ Zellen in der Abstoßung von allogenen Hauttransplantaten erscheint dies eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte. Wie in Abschnitt 5.2 erläutert, zeigte sich in verschiedensten Situationen, dass CD8⁺ T-Zellen trotz Abwesenheit oder Blockade von Kostimulation durch Allotransplantation aktiviert werden konnten. Diese aktivierten CD8⁺ T-Zellen könnten NK-Marker hochregulieren, durch anti-NK1.1 ebenso wie durch anti-AsialoGM1 depletiert werden, und dieser Effekt könnte für das beobachtete verlängerte Transplantat-Überleben verantwortlich sein.

Durch die von Assarsson *et al.* durchgeführte *in vitro* Stimulation von CD8⁺ T-Zellen mit IL-2 erwarben viele (15-55 %) Zellen neben NK1.1 auch die inhibitorischen Rezeptoren Ly49A, Ly49C/I, oder Ly49G2. Es ist daher durchaus denkbar, dass das Prinzip der Inhibition durch Selbst-MHC-I-Moleküle nicht auf NK-Zellen beschränkt ist, sondern auch einen regulatorischen Mechanismus für aktivierte T-Zellen darstellt. Wenn dies zuträfe, wäre es möglich, dass semiallogene Transplantation zu einer Inhibition von aktivierten CD8⁺ T-Zellen führt und dieser Mechanismus, alternativ oder zusätzlich zu einer Inhibition von NK-Zellen, für das beobachtete Langzeit-Überleben von semiallogenen Transplantaten in CD28-defizienten Empfängern verantwortlich ist. Die Rolle von verschiedenen Populationen von NK-T-Zellen und NK-Zellen in der Abstoßung allogener Herztransplantate in Abwesenheit von CD28 sollte auf jeden Fall weiter untersucht werden.

5.6 ROLLE VON NK1.1 POSITIVEN ZELLEN BEI DER INITIIERUNG UND BEEINFLUSSUNG VON ADAPTIVEN IMMUNANTWORTEN

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Rolle von NK1.1 exprimierenden Zellen in der Abstoßung von allogenen Herztransplantaten in der Abwesenheit von CD28-Kostimulation. Wie in 5.3 erläutert, sind NK-Zellen allein nicht in der Lage, solide Organtransplantate abzustößen. Trotzdem könnten NK- oder NK-T-Zellen durch direkte Zerstörung von Transplantatzellen, durch Bereitstellung von Hilfe für T-Zellen oder durch Aktivierung von APZ eine wichtige Rolle in der Transplantatabstoßung spielen (siehe Abbildung 5.2). Wildtyp-Mäuse stießen semiallogene Transplantate nur gering verzögert ab, und anti-NK1.1-Depletion hatte in Wildtyp-Empfängern keinen signifikanten Effekt auf die Abstoßung von allogenen Transplantaten. In der Anwesenheit von CD28 scheinen T-Zellen daher ohne die „Hilfe“ von NK- oder NK-T-Zellen aktiviert werden zu können. Ohne ein kostimulatorisches Signal über CD28 jedoch ist semiallogene Transplantation nicht in der Lage, eine für die Abstoßung ausreichende T-Zell-Aktivierung hervorzurufen. Bei allogener Transplantation in Abwesenheit von CD28 ist denkbar, dass durch „Missing Self“ NK-Zellen oder NK-T-Zellen aktiviert werden, die dazu führen, dass die CD28-defizienten T-Zellen dennoch suffizient aktiviert werden. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob es sich bei der verantwortlichen Zellpopulation um NK- oder NK-T-Zellen handelt. Ebenso kann über die Mechanismen einer solchen „Hilfe“ durch NK- oder NK-T-Zellen nur spekuliert werden. Aufgrund der *in vitro* Ergebnisse, dass der Proliferationsdefekt von CD28-defizienten T-Zellen durch Zugabe von exogenem IL-2 teilweise aufgehoben werden kann, erscheint es möglich, dass *in vivo* durch aktivierte NK- oder NK-T-Zellen Zytokine produziert werden, die den Kostimulationsdefekt der T-Zellen ausgleichen. Auch eine Hilfe durch direkte Zell-Zell-Interaktionen ist denkbar. Des Weiteren könnten NK- oder NK-T-Zellen indirekt zu einer CD28-unabhängigen Aktivierung von T-Zellen beitragen, indem sie APZ stimulieren, die daraufhin neue Signale für T-Zellen bereitstellen.

Bei der Infektion eines Organismus mit pathogenen Erregern spielt die Erkennung von PAMPs durch das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle für die Initiierung und Beeinflussung einer adaptiven Immunantwort. NK-Zellen könnten eine parallele Rolle für die Induktion von adaptiven Immunantworten spielen. So könnte neben der Positiv-Erkennung (PAMPs und PRRs) auch die Negativ-Erkennung von pathologischen Situationen des angeborenen Immunsystems für die Induktion von adaptiven Immunantworten genutzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit schlagen einen Einfluss von NK-Zellen auf die adaptive Immunantwort gegen Allotransplantate vor. Interessanterweise wurde durch die Gruppe von Ljunggren kürzlich eine analoge Rolle natürlicher Killerzellen bei der Induktion einer adaptiven Immunantwort im Modell der experimentellen Myasthenia gravis beschrieben (Shi et al., 2000). Ob die Initiierung und Beeinflussung von adaptiven Immunantworten eine generelle physiologische Funktion von NK-Zellen darstellt, wird sich vermutlich in den nächsten Jahren herausstellen.

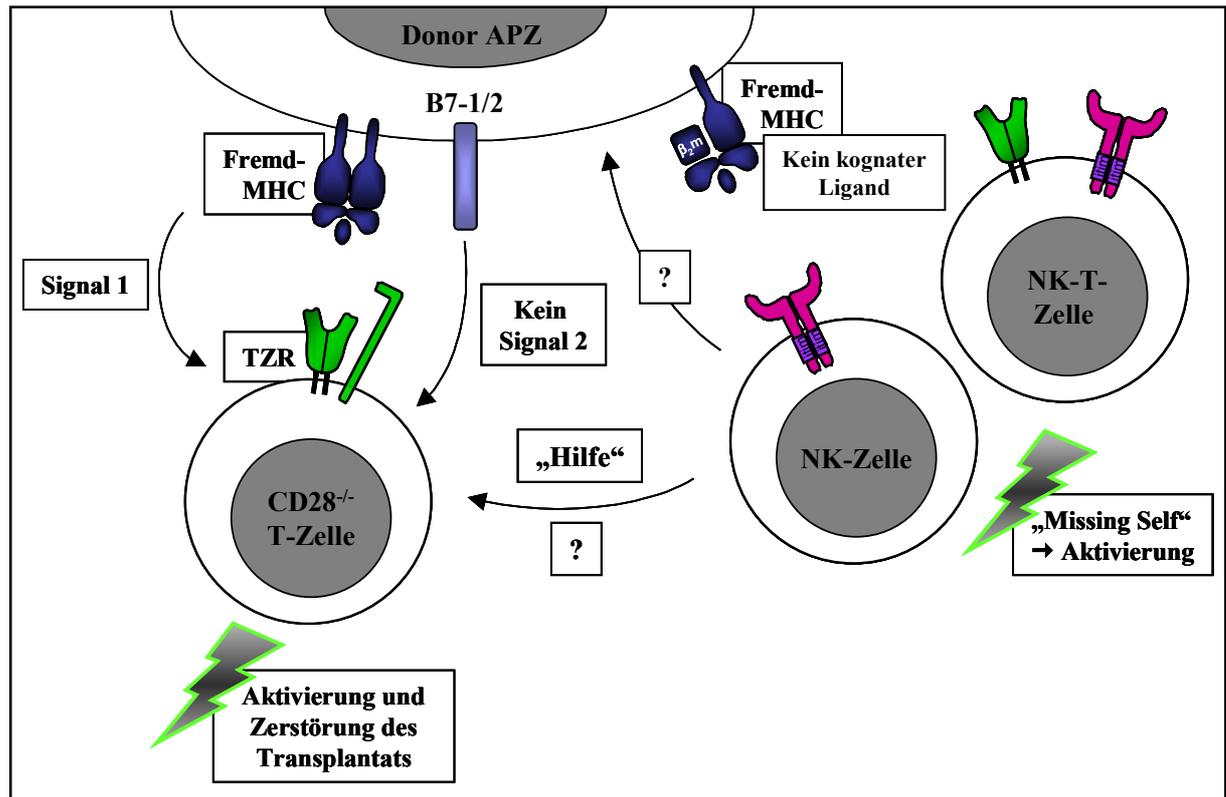


Abbildung 5.2: Modell zur Rolle von NK-/NK-T-Zellen bei der Abstoßung allogener Organtransplantate in der Abwesenheit von CD28-Kostimulation.

CD28-defiziente T-Zellen erhalten kein Signal 2 durch auf den APZ exprimierte B7-Moleküle. Bei Transplantation von vollallogenen Transplantaten kann es aufgrund des Fehlens von Selbst-Liganden für inhibitorische Rezeptoren zur Aktivierung von NK- und NK-T-Zellen kommen. Diese könnten, direkt oder indirekt über Stimulation der APZ, ein aktivierendes Signal (durch Zytokinproduktion oder Zell-Zell-Interaktion) an die T-Zellen liefern, durch welches der Kostimulationsdefekt überwunden wird.

5.7 KLINISCHE IMPLIKATIONEN DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Arbeit schlagen eine Rolle von NK-Zellen in der Abstoßung von allogenen soliden Organtransplantaten vor. Insgesamt haben NK-Zellen in der Therapie der Abstoßung von soliden Organtransplantaten beim Menschen bisher keine Beachtung gefunden. Eine Hemmung von NK-Zellen könnte sich aber positiv auf das Transplantat-Überleben auswirken und immunsuppressive Therapieschemata, die auch NK-Zellen hemmen, könnten anderen Therapien überlegen sein. Von den bisher beim Menschen eingesetzten Immunsuppressiva ist bekannt, dass Rapamycin im Gegensatz zum Standard-Immunsuppressivum CyclosporinA auch NK-Zellen hemmt (Chen et al., 1993; Thomson et al., 1993). Weitere immunsuppressive Medikamente sollten auf ihre Fähigkeit, NK-Zellen zu inhibieren, untersucht werden. Die Entwicklung neuer Strategien zur Inhibition von NK-Zellen, sei es durch Interferenz mit positiven Signalen oder durch Bereitstellen von Liganden für inhibitorische Rezeptoren, erscheint lohnenswert. Inhibitorische Rezeptoren sind nicht auf NK-Zellen beschränkt. Die Induktion oder Verstärkung

inhibitorischer Signale stellt ein neues, möglicherweise in vielen Zellkompartimenten des Immunsystems wirksames, Konzept dar, das neue Wege der Immunsuppression zur Verbesserung von Langzeit-Transplantat-Überleben eröffnet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen weiterhin vermuten, dass auch beim Menschen Kostimulationsblockade bei Transplantationen mit MHC-matching deutlich erfolgreicher sein könnte als in stark MHC-differenten Situationen. Derzeit wird bei der Nierentransplantation ein MHC-matching durchgeführt. Empfänger von Nieren, die mindestens haploidentisch sind, könnten mit CTLA-4-Ig behandelt und NK-Zell-Aktivierung sowie Transplantat-Überleben überwacht werden. Herztransplantationen werden ohne MHC-matching durchgeführt. Aufgrund der kleineren Anzahl von Transplantaten und der geringeren Ischämietoleranz von Herz- im Vergleich zu Nierentransplantaten scheinen die Vorteile eines kürzeren Transportweges bei der Herztransplantation die Nachteile einer größeren MHC-Differenz zu überwiegen. In Anbetracht des Langzeit-Überlebens von semiallogenen Herztransplantaten in CD28-defizienten Mäusen sollte dies jedoch für immunsuppressive Therapien mit Kostimulationsblockade neu überdacht werden.

5.8 AUSBLICK

Auf der Basis der gewonnenen Ergebnisse sollten sich zukünftige Forschungsarbeiten mit der Fragestellung befassen, welche NK1.1 exprimierende Zellpopulation für die Abstoßung von allogenen Herztransplantaten in Abwesenheit von CD28 verantwortlich ist. Da weder NK-Zell-defiziente Mäuse ohne andere wesentliche Defekte noch ein wirklich NK-spezifischer Antikörper zur Verfügung stehen, könnte hier der Umweg über einen adaptiven Transfer durchflußzytometrisch sortierter Zellen gewählt werden. Mäuse mit einer Deletion der mit der gemeinsamen γ_c -Kette (γ_c) assoziierten Tyrosinkinase Jak3 zeigen eine schwere kombinierte Immundefizienz. Sie besitzen drastisch reduzierte Anzahlen von B- und $\alpha\beta$ -T-Zellen; $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen fehlen vollständig (Park et al., 1995). Diese Mäuse könnten als Empfänger für CD28-defiziente Lymphozyten verwendet werden, aus denen durchflußzytometrisch selektiv NK1.1⁺CD3⁻ NK-Zellen entfernt wurden. Dadurch erhielte man Mäuse, deren T-Zellen CD28-defizient sind und die keine NK-Zellen besitzen. Problematisch bei diesem Ansatz könnte sein, dass anti-NK1.1 ein stimulierender Antikörper ist. Effekte durch die Wirkung des Antikörpers auf die transferierten NK1.1⁺CD3⁺ Zellen müssten daher ausgeschlossen werden. Alternativ könnten auch γ_c -defiziente Mäuse als Empfänger für den Transfer verwendet werden.

Weiterhin wäre es interessant, zu untersuchen, welcher Subpopulation von NK-T-Zellen die in den Transplantaten nachgewiesenen NK1.1⁺CD3⁺ Zellen angehören. Hierzu soll eine Mehrfachfärbung für die Durchflußzytometrie etabliert werden, mit der man die NK1.1⁺CD3⁺ Zellen aufgrund ihrer Expression von CD4 und CD8 weiter differenzieren kann. V α 14-NK-T-Zellen können entweder direkt durch CD1d/ α -Gal-Cer-Tetramere oder - einfacher, aber dafür etwas

weniger präzise - durch Nachweis der von $V\alpha 14$ -NK-T-Zellen vorwiegend exprimierten $V\beta 8.2$ -Kette detektiert werden. Abhängig von den Ergebnissen würden sich weitere Experimente anbieten. Die Transplantation in NK-T/CD28 doppelt defiziente Mäuse (siehe 5.5.4) wäre insbesondere dann interessant, wenn in allogenen Transplantaten $V\alpha 14$ -NK-T-Zellen nachgewiesen werden können. Sind die Transplantat infiltrierenden $NK1.1^+CD3^+$ Zellen dagegen vorwiegend $CD8^+$, so könnte der Gedankengang, dass es sich hierbei um $CD8^+$ T-Zellen handelt, die im Laufe der Allo-Aktivierung NK-Marker aquiriert haben, weiter verfolgt werden. Hierzu könnte ein adoptiver Transfer ähnlich wie oben beschrieben durchgeführt werden, mit dem Unterschied, dass in diesem Fall alle $NK1.1^+$ Zellen oder gezielt die $NK1.1^+CD3^+$ Zellen entfernt würden. Interessant wäre neben dem Effekt auf das Transplantat-Überleben auch die Fragestellung, ob und mit welcher Kinetik $CD8^+$ NK-T-Zellen nach einer allogenen Transplantation in der Zirkulation wieder nachweisbar werden.

Im klinischen Alltag sind akute Abstoßungsperioden heute in der Mehrzahl der Fälle durch eine rechtzeitig einsetzende adäquate Therapie zu beherrschen. Trotzdem verlieren derzeit ca. die Hälfte der Herztransplantatempfänger ihr Transplantat innerhalb der ersten 10 Jahre (Hosenpud et al., 1999). Dieser Verlust ist in der Mehrzahl der Fälle durch eine chronische Transplantatabstoßung bedingt, deren Mechanismen und damit auch Therapiemöglichkeiten zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausreichend bekannt sind. Semiallogen in CD28-defiziente Mäuse transplantierte Herzen zeigten nach 100 Tagen keine Anzeichen einer chronischen Abstoßung. Die Untersuchung der Rolle von natürlichen Killerzellen in der chronischen Transplantatabstoßung erscheint daher sinnvoll.

Sehr interessant und langfristig möglicherweise von erheblicher klinischer Relevanz ist das Konzept, dass sich durch Selbst-MHC-I-Moleküle NK-Zellen, und eventuell auch weitere Zellpopulationen des Immunsystems, inhibieren lassen. Wie in 5.4.2 erläutert, sollte der Einfluss von Selbst-MHC-I auf das Transplantat-Überleben noch eindeutig durch die Verwendung von MHC-I-defizienten Spendern nachgewiesen werden. Ein interessanter Ansatz ist auch die Fragestellung, ob sich NK-Zellen auch durch nicht zellständige MHC-I-Moleküle inhibieren lassen. Hierzu könnten MHC-I-Tetramere verwendet werden. Zunächst sollte in einem Chrom-Freisetzung-Assay getestet werden, ob sich die Zytotoxizität von isolierten NK-Zellen durch die Zugabe von Selbst-MHC-I-Tetrameren inhibieren lässt. Auch der Einfluss auf die Effektorfunktion der Zytokinproduktion (insbesondere $IFN\gamma$) könnte untersucht werden. Falls sich *in vitro* eine Inhibition von NK-Zellen durch MHC-I-Tetramere zeigen lässt, so könnte dieses Konzept auf *in vivo* Situationen übertragen und in unterschiedlichen murinen Modellen, in denen NK-Zellen eine Rolle zu spielen scheinen, getestet werden. Neben der allogenen Transplantation in Abwesenheit von CD28-Kostimulation wäre ein weiteres interessante Anwendungsgebiet die experimentell induzierte Myasthenia gravis (Shi et al., 2000).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Immunreaktion gegen Transplantate ist bisher nicht vollständig geklärt. Angesichts der entscheidenden Rolle, die das angeborene Immunsystem in der Regulierung von Immunreaktionen gegen Pathogene spielt, ist eine interessante Fragestellung, ob eine vergleichbare Funktion von Mechanismen des angeborenen Immunsystems auch in der Immunreaktion gegen Fremd-Gewebe existiert. Es ist bekannt, dass natürliche Killerzellen eine wichtige Rolle in der Abstoßung von hämatopoetischen Transplantaten spielen. Im Gegensatz dazu war bisher nicht klar, ob natürliche Immunität auch eine Funktion in der Abstoßung von soliden Organtransplantaten besitzt.

Das kostimulatorische Molekül CD28 besitzt eine wichtige Funktion für die T-Zell-Aktivierung. Dennoch werden allogene Transplantate sowohl von CD28-defizienten als auch von mit Kostimulationsblockade behandelten Mäusen abgestoßen, die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher nicht geklärt. Um die Rolle von angeborener und adaptiver Immunität bei der Abstoßung von soliden Organtransplantaten zu untersuchen, wurden die Effekte der Inaktivierung von zentralen Systemen des angeborenen (NK-Zellen) und des adaptiven (CD28-Kostimulation) Immunsystems auf die Abstoßung von allogenen Herztransplantaten untersucht.

In Wildtyp- und CD28^{-/-} Mäusen wurden heterotope Herztransplantationen durchgeführt. Zur Untersuchung des Einflusses des angeborenen Immunsystems wurden einerseits vollallogene Transplantate und andererseits semiallogene Transplantate - für die postuliert wird, dass die auf den Transplantatzellen vorhandenen Selbst-MHC-I-Moleküle über inhibitorische NK-Rezeptoren Mechanismen der angeborenen Immunität hemmen - verwendet. Als ein zweiter Ansatz zur Untersuchung der Rolle von Zellen mit NK-Rezeptoren wurde ein Protokoll etabliert, um durch wiederholte Antikörper-Injektionen NK-Zellen effektiv zu depletieren. Weder CD28-Defizienz noch NK-Inaktivierung allein führten zur Akzeptanz von Herztransplantaten. Dagegen führte NK-Depletion zu einem deutlich verlängerten Überleben allogener Herztransplantate. Interessanterweise wurden semiallogene Herzen von CD28^{-/-} Empfängern akzeptiert.

Das zelluläre Infiltrat in Herztransplantaten wurde durch Immunhistochemie und, nach Kollagenase-Verdau der Transplantate und Aufreinigung der mononukleären Zellen durch Perkoll-Dichtegradienten-Zentrifugation, durchflußzytometrisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl NK- als auch NK-T-Zellen in allogene Herztransplantate infiltrieren. In semiallogen in CD28^{-/-} Mäuse transplantierten Herzen waren dagegen insgesamt nur sehr geringe Anzahlen von mononukleären Zellen nachzuweisen. Die Analyse der Zytokin Expression in Herztransplantaten durch RNase-Protection Assay und semiquantitative PCR zeigte eine Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL6 und IFN γ) in semiallogen in CD28-defiziente Empfänger transplantierten Herzen verglichen mit den in der abstoßenden Gruppen gefundenen Zytokin-mRNA-Expression.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse eine bisher nicht bekannte Rolle von Zellen mit inhibitorischen NK-Rezeptoren bei der Abstoßung von soliden Organtransplantaten, die in der Abwesenheit von CD28-Kostimulation deutlich wird.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abbas,A.K. and Janeway,C.A., Jr. (2000). Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* 100, 129-138.

Abbas,A.K., Lichtman,A.H., and Pober,J.S. (2000a). Cytokines that Mediate and Regulate Innate Immunity. In *Cellular and Molecular Immunology*, W.Schmitt, H.N.Hacker, and J.Ehlers, eds. (Philadelphia: W.B. Saunders), pp. 249-251.

Abbas,A.K., Lichtman,A.H., and Pober,J.S. (2000b). Physiologic and Pathologic Response to Bacterial Lipopolysaccharide. In *Cellular and Molecular Immunology*, W.Schmitt, H.N.Hacker, and J.Ehlers, eds. (Philadelphia: W.B. Saunders), pp. 277-278.

Abbas,A.K., Lichtman,A.H., and Pober,J.S. (2000c). Prevention and Treatment of Allograft Rejection. In *Cellular and Molecular Immunology*, W.Schmitt, H.N.Hacker, and J.Ehlers, eds. (Philadelphia: W.B. Saunders), pp. 375-378.

Algarra,I., Cabrera,T., and Garrido,F. (2000). The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum. Immunol.* 61, 65-73.

Allen,P.M. (1994). Peptides in positive and negative selection: a delicate balance. *Cell* 76, 593-596.

Almond,P.S., Matas,A., Gillingham,K., Dunn,D.L., Payne,W.D., Gores,P., Gruessner,R., and Najarian,J.S. (1993). Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 55, 752-756.

Anegon,I., Cuturi,M.C., Trinchieri,G., and Perussia,B. (1988). Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 167, 452-472.

Arase,N., Arase,H., Park,S.Y., Ohno,H., Ra,C., and Saito,T. (1997). Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. *J. Exp. Med.* 186, 1957-1963.

Armitage,R.J., Maliszewski,C.R., Alderson,M.R., Grabstein,K.H., Spriggs,M.K., and Fanslow,W.C. (1993). CD40L: a multi-functional ligand. *Semin. Immunol.* 5, 401-412.

Assarsson,E., Kambayashi,T., Sandberg,J.K., Hong,S., Taniguchi,M., Van Kaer,L., Ljunggren,H.G., and Chambers,B.J. (2000). CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 165, 3673-3679.

Atkinson,J.P. and Farries,T. (1987). Separation of self from non-self in the complement system. *Immunol. Today* 8, 212-215.

- August,A., Gibson,S., Kawakami,Y., Kawakami,T., Mills,G.B., and Dupont,B. (1994). CD28 is associated with and induces the immediate tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase ITK/EMT in the human Jurkat leukemic T-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 9347-9351.
- Azuma,M., Ito,D., Yagita,H., Okumura,K., Phillips,J.H., Lanier,L.L., and Somoza,C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366, 76-79.
- Balzano,C., Buonavista,N., Rouvier,E., and Golstein,P. (1992). CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. *Int. J. Cancer Suppl* 7, 28-32.
- Bauer,S., Groh,V., Wu,J., Steinle,A., Phillips,J.H., Lanier,L.L., and Spies,T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress- inducible MICA. *Science* 285, 727-729.
- Becker,S., Kiessling,R., Lee,N., and Klein,G. (1978). Modulation of sensitivity to natural killer cell lysis after in vitro explantation of a mouse lymphoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 61, 1495-1498.
- Bendelac,A. and Fearon,D.T. (1997). Innate pathways that control acquired immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 1-3.
- Bennett,M. (1987). Biology and genetics of hybrid resistance. *Adv. Immunol.* 41, 333-445.
- Bennett,M., Yu,Y.Y., Stoneman,E., Rembecki,R.M., Mathew,P.A., Lindahl,K.F., and Kumar,V. (1995). Hybrid resistance: 'negative' and 'positive' signaling of murine natural killer cells. *Semin. Immunol.* 7, 121-127.
- Biassoni,R., Cantoni,C., Falco,M., Verdiani,S., Bottino,C., Vitale,M., Conte,R., Poggi,A., Moretta,A., and Moretta,L. (1996). The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J. Exp. Med.* 183, 645-650.
- Binah,O. (1994). Immune effector mechanisms in heart transplant rejection. *Cardiovasc. Res.* 28, 1748-1757.
- Binstadt,B.A., Brumbaugh,K.M., Dick,C.J., Scharenberg,A.M., Williams,B.L., Colonna,M., Lanier,L.L., Kinet,J.P., Abraham,R.T., and Leibson,P.J. (1996). Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity.* 5, 629-638.
- Bix,M., Liao,N.S., Zijlstra,M., Loring,J., Jaenisch,R., and Raulet,D. (1991). Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC- matched mice. *Nature* 349, 329-331.
- Boise,L.H., Minn,A.J., Noel,P.J., June,C.H., Accavitti,M.A., Lindsten,T., and Thompson,C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity.* 3, 87-98.
- Bolton,E.M., Gracie,J.A., Briggs,J.D., Kampinga,J., and Bradley,J.A. (1989). Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *J. Exp. Med.* 169, 1931-1946.

- Borrego,F., Ulbrecht,M., Weiss,E.H., Coligan,J.E., and Brooks,A.G. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J. Exp. Med.* *187*, 813-818.
- Boussiotis,V.A., Freeman,G.J., Gribben,J.G., and Nadler,L.M. (1996). The role of B7-1/B7-2:CD28/CLTA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. *Immunol. Rev.* *153*, 5-26.
- Boussiotis,V.A., Gribben,J.G., Freeman,G.J., and Nadler,L.M. (1994). Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* *6*, 797-807.
- Braud,V.M., Allan,D.S., O'Callaghan,C.A., Soderstrom,K., D'Andrea,A., Ogg,G.S., Lazetic,S., Young,N.T., Bell,J.I., Phillips,J.H., Lanier,L.L., and McMichael,A.J. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* *391*, 795-799.
- Breedveld,F.C. (2000). Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* *355*, 735-740.
- Bretscher,P. and Cohn,M. (1970). A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* *169*, 1042-1049.
- Brower,R.C., England,R., Takeshita,T., Kozlowski,S., Margulies,D.H., Berzofsky,J.A., and Delisi,C. (1994). Minimal requirements for peptide mediated activation of CD8+ CTL. *Mol. Immunol.* *31*, 1285-1293.
- Brown,M.H., Boles,K., van der Merwe,P.A., Kumar,V., Mathew,P.A., and Barclay,A.N. (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* *188*, 2083-2090.
- Brumbaugh,K.M., Binstadt,B.A., and Leibson,P.J. (1998). Signal transduction during NK cell activation: balancing opposing forces. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *230*, 103-122.
- Brunet,J.F., Denizot,F., Luciani,M.F., Roux-Dosseto,M., Suzan,M., Mattei,M.G., and Golstein,P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* *328*, 267-270.
- Burnet,F.M. (1957). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust. J. Sci.* *20*, 67.
- Burnet,F.M. (1959). *The Clonal Selection Theory*. (London: Cambridge University Press).
- Burshtyn,D.N., Scharenberg,A.M., Wagtmann,N., Rajagopalan,S., Berrada,K., Yi,T., Kinet,J.P., and Long,E.O. (1996). Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity.* *4*, 77-85.
- Burshtyn,D.N., Yang,W., Yi,T., and Long,E.O. (1997). A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP- 1. *J. Biol. Chem.* *272*, 13066-13072.

- Bush, W.W. (1999). Overview of transplantation immunology and the pharmacotherapy of adult solid organ transplant recipients: focus on immunosuppression. *AACN. Clin. Issues* 10, 253-269.
- Cai, Z. and Sprent, J. (1996). Influence of antigen dose and costimulation on the primary response of CD8+ T cells in vitro. *J. Exp. Med.* 183, 2247-2257.
- Calne, R., Friend, P., Moffatt, S., Bradley, A., Hale, G., Firth, J., Bradley, J., Smith, K., and Waldmann, H. (1998). Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. *Lancet* 351, 1701-1702.
- Calne, R., Moffatt, S.D., Friend, P.J., Jamieson, N.V., Bradley, J.A., Hale, G., Firth, J., Bradley, J., Smith, K.G., and Waldmann, H. (1999). Campath 1H allows low-dose cyclosporine monotherapy in 31 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 68, 1613-1616.
- Chai, J.G., Vendetti, S., Bartok, I., Schoendorf, D., Takacs, K., Elliott, J., Lechler, R., and Dyson, J. (1999). Critical role of costimulation in the activation of naive antigen-specific TCR transgenic CD8+ T cells in vitro. *J. Immunol.* 163, 1298-1305.
- Chambers, B.J., Salcedo, M., and Ljunggren, H.G. (1996). Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1). *Immunity.* 5, 311-317.
- Chan, P.Y. and Takei, F. (1989). Molecular cloning and characterization of a novel murine T cell surface antigen, YE1/48. *J. Immunol.* 142, 1727-1736.
- Chen, H., Luo, H., Daloz, P., Xu, D., Shan, X., St Louis, G., and Wu, J. (1993). Long-term in vivo effects of rapamycin on humoral and cellular immune responses in the rat. *Immunobiology* 188, 303-315.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Christinck, E.R., Luscher, M.A., Barber, B.H., and Williams, D.B. (1991). Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 352, 67-70.
- Colonna, M. (1997). Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol. Rev.* 155, 127-133.
- Correa, I. and Raulet, D.H. (1995). Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. *Immunity.* 2, 61-71.
- Cudkovic, G. and Bennett, M. (1971). Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. II. Rejection of parental grafts by resistant F 1 hybrid mice. *J. Exp. Med.* 134, 1513-1528.
- Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M. (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623-1626.

- Davis, M.M. (1995). T-cell receptors. Serial engagement proposed. *Nature* 375, 104.
- DeBenedette, M.A., Wen, T., Bachmann, M.F., Ohashi, P.S., Barber, B.H., Stocking, K.L., Peschon, J.J., and Watts, T.H. (1999). Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J. Immunol.* 163, 4833-4841.
- DeCloux, A., Woods, A.S., Cotter, R.J., Soloski, M.J., and Forman, J. (1997). Dominance of a single peptide bound to the class I(B) molecule, Qa-1b. *J. Immunol.* 158, 2183-2191.
- del Val, M., Hengel, H., Hacker, H., Hartlaub, U., Ruppert, T., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1992). Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J. Exp. Med.* 176, 729-738.
- Denton, M.D., Magee, C.C., and Sayegh, M.H. (1999). Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 353, 1083-1091.
- DeSilva, D.R., Urdahl, K.B., and Jenkins, M.K. (1991). Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J. Immunol.* 147, 3261-3267.
- Dharnidharka, V.R., Schowengerdt, K., and Skoda-Smith, S. (2000). Failure of combined costimulatory blockade in animal transplant model. *Nat. Med.* 6, 115.
- Dorshkind, K., Pollack, S.B., Bosma, M.J., and Phillips, R.A. (1985). Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). *J. Immunol.* 134, 3798-3801.
- Doty, R.T. and Clark, E.A. (1996). Subcellular localization of CD80 receptors is dependent on an intact cytoplasmic tail and is required for CD28-dependent T cell costimulation. *J. Immunol.* 157, 3270-3279.
- Ehl, S., Nuesch, R., Tanaka, T., Myasaka, M., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. (1996). A comparison of efficacy and specificity of three NK depleting antibodies. *J. Immunol. Methods* 199, 149-153.
- Essery, G., Feldmann, M., and Lamb, J.R. (1988). Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes. *Immunology* 64, 413-417.
- Fraser, I.P., Koziel, H., and Ezekowitz, R.A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* 10, 363-372.
- Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Gribben, J.G., Ng, J.W., Kim, J., Goldberg, J.M., Hathcock, K., Laszlo, G., and . (1993a). Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 178, 2185-2192.

- Freeman,G.J., Boussiotis,V.A., Anumanthan,A., Bernstein,G.M., Ke,X.Y., Rennert,P.D., Gray,G.S., Gribben,J.G., and Nadler,L.M. (1995). B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7- 2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL- 4. *Immunity*. 2, 523-532.
- Freeman,G.J., Freedman,A.S., Segil,J.M., Lee,G., Whitman,J.F., and Nadler,L.M. (1989). B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J. Immunol.* 143, 2714-2722.
- Freeman,G.J., Gribben,J.G., Boussiotis,V.A., Ng,J.W., Restivo,V.A., Jr., Lombard,L.A., Gray,G.S., and Nadler,L.M. (1993b). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262, 909-911.
- Freeman,G.J., Lombard,D.B., Gimmi,C.D., Brod,S.A., Lee,K., Laning,J.C., Hafler,D.A., Dorf,M.E., Gray,G.S., Reiser,H., and . (1992). CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. *J. Immunol.* 149, 3795-3801.
- Garni-Wagner, B. A. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. Purohit, A., Mathew, P. A., Bennett, M., and Kumar, V. *J.Immunol.* 151, 60-70. 1993.
- Ref Type: Generic
- Geldhof,A.B., Raes,G., Bakkus,M., Devos,S., Thielemans,K., and De Baetselier,P. (1995). Expression of B7-1 by highly metastatic mouse T lymphomas induces optimal natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 55, 2730-2733.
- Godfrey,D.I., Hammond,K.J., Poulton,L.D., Smyth,M.J., and Baxter,A.G. (2000). NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 21, 573-583.
- Gould,D.S. and Auchincloss,H., Jr. (1999). Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol. Today* 20, 77-82.
- Green,J.M., Noel,P.J., Sperling,A.I., Walunas,T.L., Gray,G.S., Bluestone,J.A., and Thompson,C.B. (1994). Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity*. 1, 501-508.
- Groh,V., Rhinehart,R., Randolph-Habecker,J., Topp,M.S., Riddell,S.R., and Spies,T. (2001). Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* 2, 255-260.
- Groh,V., Rhinehart,R., Secrist,H., Bauer,S., Grabstein,K.H., and Spies,T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 6879-6884.
- Gross,J.A., Callas,E., and Allison,J.P. (1992). Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J. Immunol.* 149, 380-388.

- Gudmundsdottir,H. and Turka,L.A. (1999). T cell costimulatory blockade: new therapies for transplant rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* *10*, 1356-1365.
- Gummert,J.F., Ikonen,T., and Morris,R.E. (1999). Newer immunosuppressive drugs: a review. *J. Am. Soc. Nephrol.* *10*, 1366-1380.
- Gundlach,M., Oluwole,S., D'Agati,V., Chabot,J., Broelsch,C.E., and Hardy,M.A. (1992). The role of passenger leukocytes in the immunogenicity of intestinal and cardiac allografts in the rat. *Transplant. Proc.* *24*, 1131-1132.
- Haeney,M. (1995). The immunological background to transplantation. *J. Antimicrob. Chemother.* *36 Suppl B*, 1-9.
- Hale,D.A., Gottschalk,R., Maki,T., and Monaco,A.P. (1997). Use of CTLA4-Ig in combination with conventional immunosuppressive agents to prolong allograft survival. *Transplantation* *64*, 897-900.
- Hall,B.M. (1987). Cellular infiltrates in allografts. *Transplant. Proc.* *19*, 50-56.
- Hardiman,G., Rock,F.L., Balasubramanian,S., Kastelein,R.A., and Bazan,J.F. (1996). Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. *Oncogene* *13*, 2467-2475.
- Harding,C.V. and Unanue,E.R. (1990). Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* *346*, 574-576.
- Harding,F.A. and Allison,J.P. (1993). CD28-B7 interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *J. Exp. Med.* *177*, 1791-1796.
- Harding,F.A., McArthur,J.G., Gross,J.A., Raulet,D.H., and Allison,J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* *356*, 607-609.
- Hasenkrug,K.J., Sprangrude,G.J., Nishio,J., Brooks,D.M., and Chesebro,B. (1994). Recovery from Friend disease in mice with reduced major histocompatibility complex class I expression. *J. Virol.* *68*, 2059-2064.
- Hashimoto,C., Hudson,K.L., and Anderson,K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269-279.
- Hayday,A.C., Diamond,D.J., Tanigawa,G., Heilig,J.S., Folsom,V., Saito,H., and Tonegawa,S. (1985). Unusual organization and diversity of T-cell receptor alpha-chain genes. *Nature* *316*, 828-832.
- Heidecke,C.D., Araujo,J.L., Kupiec-Weglinski,J.W., Abbud-Filho,M., Araneda,D., Stadler,J., Siewert,J., Strom,T.B., and Tilney,N.L. (1985). Lack of evidence for an active role for natural killer cells in acute rejection of organ allografts. *Transplantation* *40*, 441-444.
- Heinrich,G., Traunecker,A., and Tonegawa,S. (1984). Somatic mutation creates diversity in the major group of mouse immunoglobulin kappa light chains. *J. Exp. Med.* *159*, 417-435.

- Held, W., Dorfman, J.R., Wu, M.F., and Raulet, D.H. (1996). Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire. *Eur. J. Immunol.* *26*, 2286-2292.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* *284*, 1313-1318.
- Hoglund, P., Sundback, J., Olsson-Alheim, M.Y., Johansson, M., Salcedo, M., Ohlen, C., Ljunggren, H.G., Sentman, C.L., and Karre, K. (1997). Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse. *Immunol. Rev.* *155*, 11-28.
- Honey, K., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (1999). CD40 ligand blockade induces CD4+ T cell tolerance and linked suppression. *J. Immunol.* *163*, 4805-4810.
- Hosenpud, J.D., Bennett, L.E., Keck, B.M., Fiol, B., Boucek, M.M., and Novick, R.J. (1999). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: sixteenth official report--1999. *J. Heart Lung Transplant.* *18*, 611-626.
- Houchins, J.P., Lanier, L.L., Niemi, E.C., Phillips, J.H., and Ryan, J.C. (1997). Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J. Immunol.* *158*, 3603-3609.
- Hutchcroft, J.E. and Bierer, B.E. (1994). Activation-dependent phosphorylation of the T-lymphocyte surface receptor CD28 and associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 3260-3264.
- Hutchinson, I. (1996). The role of T lymphocytes in Rejection. In *Immunology*, Roitt, ed. (London: Mosby).
- Ikehara, Y., Yasunami, Y., Kodama, S., Maki, T., Nakano, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Ikeda, S. (2000). CD4(+) Valpha14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice. *J. Clin. Invest* *105*, 1761-1767.
- Isakov, N. (1998). Role of immunoreceptor tyrosine-based activation motif in signal transduction from antigen and Fc receptors. *Adv. Immunol.* *69*, 183-247.
- Itoh, Y. and Germain, R.N. (1997). Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* *186*, 757-766.
- Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *54 Pt 1:1-13*, 1-13.
- Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R. (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin. Immunol.* *10*, 349-350.

- Jenkins, M.K., Pardoll, D.M., Mizuguchi, J., Chused, T.M., and Schwartz, R.H. (1987). Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 5409-5413.
- Johnson, J.G. and Jenkins, M.K. (1993). Accessory cell-derived signals required for T cell activation. *Immunol. Res.* *12*, 48-64.
- Jones, G. (1973). The number of reactive cells in mouse lymphocyte cultures stimulated by phytohemagglutinin, concanavalin A or histocompatibility antigen. *J. Immunol.* *111*, 914-920.
- Jones, T.R., Hanson, L.K., Sun, L., Slater, J.S., Stenberg, R.M., and Campbell, A.E. (1995). Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Virol.* *69*, 4830-4841.
- June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M., and Thompson, C.B. (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* *15*, 321-331.
- Karlhofer, F.M., Ribaldo, R.K., and Yokoyama, W.M. (1992). MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* *358*, 66-70.
- Karlhofer, F.M. and Yokoyama, W.M. (1991). Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen. IL-2-activated NK cells possess additional specific stimulation pathways. *J. Immunol.* *146*, 3662-3673.
- Karre, K. (1991). MHC gene control of the natural killer system at the level of the target and the host. *Semin. Cancer Biol.* *2*, 295-309.
- Karre, K. (1997). How to recognize a foreign submarine. *Immunol. Rev.* *155*, 5-9.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* *319*, 675-678.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R., Klein, G., Taniguchi, K., and Grönberg, A. (1984). 16th International Leukocyte Culture Conference. August 19-25, 1984, Cambridge. Abstracts. *Immunobiology* *167*, 43-44.
- Kawai, K., Shahinian, A., Mak, T.W., and Ohashi, P.S. (1996). Skin allograft rejection in CD28-deficient mice. *Transplantation* *61*, 352-355.
- Kimachi, K., Croft, M., and Grey, H.M. (1997). The minimal number of antigen-major histocompatibility complex class II complexes required for activation of naive and primed T cells. *Eur. J. Immunol.* *27*, 3310-3317.

- Klaman,L.D. and Thorley-Lawson,D.A. (1995). Characterization of the CD48 gene demonstrates a positive element that is specific to Epstein-Barr virus-immortalized B-cell lines and contains an essential NF-kappa B site. *J. Virol.* *69*, 871-881.
- Klaus,S.J., Pinchuk,L.M., Ochs,H.D., Law,C.L., Fanslow,W.C., Armitage,R.J., and Clark,E.A. (1994). Costimulation through CD28 enhances T cell-dependent B cell activation via CD40-CD40L interaction. *J. Immunol.* *152*, 5643-5652.
- Klein,J., Chiang,C., Lofgreen,J., and Steinmuller,D. (1976). Participation of H-2 regions in heart-transplant rejection. *Transplantation* *22*, 384-390.
- Klinman,N.R. (1996). The "clonal selection hypothesis" and current concepts of B cell tolerance. *Immunity.* *5*, 189-195.
- Kopp,E.B. and Medzhitov,R. (1999). The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 13-18.
- Krensky,A.M., Weiss,A., Crabtree,G., Davis,M.M., and Parham,P. (1990). T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* *322*, 510-517.
- Krieger,N.R., Yin,D.P., and Fathman,C.G. (1996). CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection. *J. Exp. Med.* *184*, 2013-2018.
- Kundig,T.M., Shahinian,A., Kawai,K., Mittrucker,H.W., Sebзда,E., Bachmann,M.F., Mak,T.W., and Ohashi,P.S. (1996). Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity.* *5*, 41-52.
- Kwon,B.S. and Weissman,S.M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *86*, 1963-1967.
- Lafferty,K.J. (1994). A contemporary view of transplantation tolerance: an immunologist's perspective. *Clin. Transplant.* *8*, 181-187.
- Lafferty,K.J. and Cunningham,A.J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* *53*, 27-42.
- Lafferty,K.J., Prowse,S.J., Simeonovic,C.J., and Warren,H.S. (1983). Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Annu. Rev. Immunol.* *1*, 143-173.
- Lanier,L.L. (1995). The role of natural killer cells in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* *7*, 626-631.
- Lanier,L.L. (1997). Natural killer cells: from no receptors to too many. *Immunity.* *6*, 371-378.
- Lanier,L.L. (2001). On guard--activating NK cell receptors. *Nat. Immunol.* *2*, 23-27.

- Lanier,L.L., Corliss,B., Wu,J., and Phillips,J.H. (1998a). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*. 8, 693-701.
- Lanier,L.L., Corliss,B.C., Wu,J., Leong,C., and Phillips,J.H. (1998b). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391, 703-707.
- Lanier,L.L. and Phillips,J.H. (1995). NK cell recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Semin. Immunol.* 7, 75-82.
- Lanier,L.L., Yu,G., and Phillips,J.H. (1989). Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342, 803-805.
- Lanier,L.L., Yu,G., and Phillips,J.H. (1991). Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J. Immunol.* 146, 1571-1576.
- Larsen,C.P., Elwood,E.T., Alexander,D.Z., Ritchie,S.C., Hendrix,R., Tucker-Burden,C., Cho,H.R., Aruffo,A., Hollenbaugh,D., Linsley,P.S., Winn,K.J., and Pearson,T.C. (1996). Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 381, 434-438.
- Larsen,C.P., Ritchie,S.C., Hendrix,R., Linsley,P.S., Hathcock,K.S., Hodes,R.J., Lowry,R.P., and Pearson,T.C. (1994). Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7- 1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J. Immunol.* 152, 5208-5219.
- Lassila,O., Vainio,O., and Matzinger,P. (1988). Can B cells turn on virgin T cells? *Nature* 334, 253-255.
- Latchman,Y., McKay,P.F., and Reiser,H. (1998). Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J. Immunol.* 161, 5809-5812.
- Lazetic,S., Chang,C., Houchins,J.P., Lanier,L.L., and Phillips,J.H. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J. Immunol.* 157, 4741-4745.
- Legendre,V., Boyer,C., Guerder,S., Arnold,B., Hammerling,G., and Schmitt-Verhulst,A.M. (1999). Selection of phenotypically distinct NK1.1+ T cells upon antigen expression in the thymus or in the liver. *Eur. J. Immunol.* 29, 2330-2343.
- Leibson,P.J. (1997). Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity*. 6, 655-661.
- Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M., and Hoffmann,J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.

- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 14614-14619.
- Lenschow, D.J., Su, G.H., Zuckerman, L.A., Nabavi, N., Jellis, C.L., Gray, G.S., Miller, J., and Bluestone, J.A. (1993). Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 11054-11058.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 233-258.
- Li, Y., Zheng, X.X., Li, X.C., Zand, M.S., and Strom, T.B. (1998). Combined costimulation blockade plus rapamycin but not cyclosporine produces permanent engraftment. *Transplantation* *66*, 1387-1388.
- Li, Y., Li, X.C., Zheng, X.X., Wells, A.D., Turka, L.A., and Strom, T.B. (1999). Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat. Med.* *5*, 1298-1302.
- Liao, N.S., Bix, M., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Raulet, D. (1991). MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* *253*, 199-202.
- Lin, H., Rathmell, J.C., Gray, G.S., Thompson, C.B., Leiden, J.M., and Alegre, M.L. (1998). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. *J. Exp. Med.* *188*, 199-204.
- Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991a). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* *173*, 721-730.
- Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991b). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* *174*, 561-569.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J.A., Anasetti, C., and Damle, N.K. (1992a). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *176*, 1595-1604.
- Linsley, P.S. and Ledbetter, J.A. (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* *11*, 191-212.
- Linsley, P.S., Wallace, P.M., Johnson, J., Gibson, M.G., Greene, J.L., Ledbetter, J.A., Singh, C., and Tepper, M.A. (1992b). Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* *257*, 792-795.

- Liu,Z., Sun,Y.K., Xi,Y.P., Maffei,A., Reed,E., Harris,P., and Suci-Foca,N. (1993). Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J. Exp. Med.* *177*, 1643-1650.
- Ljunggren,H.G. and Karre,K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* *162*, 1745-1759.
- Ljunggren,H.G. and Karre,K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* *11*, 237-244.
- Long,E.O. (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 875-904.
- Lopez-Botet,M., Bellon,T., Llano,M., Navarro,F., Garcia,P., and de Miguel,M. (2000). Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum. Immunol.* *61*, 7-17.
- Lu,P., Zhou,X., Chen,S.J., Moorman,M., Morris,S.C., Finkelman,F.D., Linsley,P., Urban,J.F., and Gause,W.C. (1994). CTLA-4 ligands are required to induce an in vivo interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. *J. Exp. Med.* *180*, 693-698.
- Maier, S. Einfluß kostimulatorischer Moleküle (CD28 knock-out-Defekt) und TCR-vermittelter Signale auf die Herz-Transplantatabstoßung in der Maus. 28-30. 1998. Technische Universität München.
Ref Type: Thesis/Dissertation.
- Malarkannan,S., Shih,P.P., Eden,P.A., Horng,T., Zuberi,A.R., Christianson,G., Roopenian,D., and Shastri,N. (1998). The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J. Immunol.* *161*, 3501-3509.
- Maliszewski,C.R., Grabstein,K., Fanslow,W.C., Armitage,R., Spriggs,M.K., and Sato,T.A. (1993). Recombinant CD40 ligand stimulation of murine B cell growth and differentiation: cooperative effects of cytokines. *Eur. J. Immunol.* *23*, 1044-1049.
- Manning,T.C., Rund,L.A., Gruber,M.M., Fallarino,F., Gajewski,T.F., and Kranz,D.M. (1997). Antigen recognition and allogeneic tumor rejection in CD8+ TCR transgenic/RAG(-/-) mice. *J. Immunol.* *159*, 4665-4675.
- Mason,L.H., Anderson,S.K., Yokoyama,W.M., Smith,H.R., Winkler-Pickett,R., and Ortaldo,J.R. (1996). The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells. *J. Exp. Med.* *184*, 2119-2128.
- Mathew,P.A., Garni-Wagner,B.A., Land,K., Takashima,A., Stoneman,E., Bennett,M., and Kumar,V. (1993). Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J. Immunol.* *151*, 5328-5337.
- Matzinger,P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 991-1045.

- Mauri,D.N., Ebner,R., Montgomery,R.I., Kochel,K.D., Cheung,T.C., Yu,G.L., Ruben,S., Murphy,M., Eisenberg,R.J., Cohen,G.H., Spear,P.G., and Ware,C.F. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*. 8, 21-30.
- McAdam,A.J., Farkash,E.A., Gewurz,B.E., and Sharpe,A.H. (2000). B7 costimulation is critical for antibody class switching and CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte generation in the host response to vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 74, 203-208.
- McAdam,A.J., Schweitzer,A.N., and Sharpe,A.H. (1998). The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* 165, 231-247.
- McCoy,K.D. and Le Gros,G. (1999). The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol. Cell Biol.* 77, 1-10.
- Medzhitov,R. and Janeway,C., Jr. (2000a). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173:89-97, 89-97.
- Medzhitov,R. and Janeway,C., Jr. (2000b). Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343, 338-344.
- Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (1996). On the semantics of immune recognition. *Res. Immunol.* 147, 208-214.
- Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 4-9.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A., Jr. (1997a). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., Kopp,E., Stadlen,A., Chen,C., Ghosh,S., and Janeway,C.A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253-258.
- Melton,D.A., Krieg,P.A., Rebagliati,M.R., Maniatis,T., Zinn,K., and Green,M.R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* 12, 7035-7056.
- Merion,R.M., Howell,T., and Bromberg,J.S. (1998). Partial T-cell activation and anergy induction by polyclonal antithymocyte globulin. *Transplantation* 65, 1481-1489.
- Moretta,A., Vitale,M., Bottino,C., Orengo,A.M., Morelli,L., Augugliaro,R., Barbaresi,M., Ciccone,E., and Moretta,L. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J. Exp. Med.* 178, 597-604.

- Moretta,L., Ciccone,E., Poggi,A., Mingari,M.C., and Moretta,A. (1994). Ontogeny, specific functions and receptors of human natural killer cells. *Immunol. Lett.* *40*, 83-88.
- Mullis,K.B. and Faloona,F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* *155*, 335-350.
- Muzio,M., Ni,J., Feng,P., and Dixit,V.M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL- 1 signaling. *Science* *278*, 1612-1615.
- Nandi,D., Gross,J.A., and Allison,J.P. (1994). CD28-mediated costimulation is necessary for optimal proliferation of murine NK cells. *J. Immunol.* *152*, 3361-3369.
- Newell,K.A., He,G., Guo,Z., Kim,O., Szot,G.L., Rulifson,I., Zhou,P., Hart,J., Thistlethwaite,J.R., and Bluestone,J.A. (1999). Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells. *J. Immunol.* *163*, 2358-2362.
- Nilsson,N., Bremell,T., Tarkowski,A., and Carlsten,H. (1999). Protective role of NK1.1+ cells in experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* *117*, 63-69.
- Nomura,M., Zou,Z., Joh,T., Takihara,Y., Matsuda,Y., and Shimada,K. (1996). Genomic structures and characterization of Rae1 family members encoding GPI-anchored cell surface proteins and expressed predominantly in embryonic mouse brain. *J. Biochem. (Tokyo)* *120*, 987-995.
- Nunes,J.A., Truneh,A., Olive,D., and Cantrell,D.A. (1996). Signal transduction by CD28 costimulatory receptor on T cells. B7-1 and B7-2 regulation of tyrosine kinase adaptor molecules. *J. Biol. Chem.* *271*, 1591-1598.
- O'Reilly,R.J., Brochstein,J., Collins,N., Keever,C., Kapoor,N., Kirkpatrick,D., Kernan,N., Dupont,B., Burns,J., and Reisner,Y. (1986). Evaluation of HLA-haplotype disparate parental marrow grafts depleted of T lymphocytes by differential agglutination with a soybean lectin and E-rosette depletion for the treatment of severe combined immunodeficiency. *Vox Sang.* *51 Suppl 2*, 81-86.
- Olsson,M.Y., Karre,K., and Sentman,C.L. (1995). Altered phenotype and function of natural killer cells expressing the major histocompatibility complex receptor Ly-49 in mice transgenic for its ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 1649-1653.
- Ortaldo,J.R., Winkler-Pickett,R., Mason,A.T., and Mason,L.H. (1998). The Ly-49 family: regulation of cytotoxicity and cytokine production in murine CD3+ cells. *J. Immunol.* *160*, 1158-1165.
- Pages,F., Ragueneau,M., Rottapel,R., Truneh,A., Nunes,J., Imbert,J., and Olive,D. (1994). Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T- cell signalling. *Nature* *369*, 327-329.
- Park,S.Y., Saijo,K., Takahashi,T., Osawa,M., Arase,H., Hirayama,N., Miyake,K., Nakauchi,H., Shirasawa,T., and Saito,T. (1995). Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity.* *3*, 771-782.

- Pearson,T.C., Alexander,D.Z., Winn,K.J., Linsley,P.S., Lowry,R.P., and Larsen,C.P. (1994). Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. *Transplantation* 57, 1701-1706.
- Pende,D., Parolini,S., Pessino,A., Sivori,S., Augugliaro,R., Morelli,L., Marcenaro,E., Accame,L., Malaspina,A., Biassoni,R., Bottino,C., Moretta,L., and Moretta,A. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 190, 1505-1516.
- Perarnau,B., Saron,M.F., San Martin,B.R., Bervas,N., Ong,H., Soloski,M.J., Smith,A.G., Ure,J.M., Gairin,J.E., and Lemonnier,F.A. (1999). Single H2Kb, H2Db and double H2KbDb knockout mice: peripheral CD8+ T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *Eur. J. Immunol.* 29, 1243-1252.
- Perera,L.P. (2000). Interleukin 15: its role in inflammation and immunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 48, 457-464.
- Perico,N. and Remuzzi,G. (1997). Prevention of transplant rejection: current treatment guidelines and future developments. *Drugs* 54, 533-570.
- Pessino,A., Sivori,S., Bottino,C., Malaspina,A., Morelli,L., Moretta,L., Biassoni,R., and Moretta,A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 188, 953-960.
- Petersson,E., Ostraat,O., Ekberg,H., Hansson,J., Simanaitis,M., Brodin,T., Dohlsten,M., and Hedlund,G. (1997). Allogeneic heart transplantation activates alloreactive NK cells. *Cell Immunol.* 175, 25-32.
- Pietra,B.A., Wiseman,A., Bolwerk,A., Rizeq,M., and Gill,R.G. (2000). CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J. Clin. Invest* 106, 1003-1010.
- Ploegh,H.L. (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* 280, 248-253.
- Pollok,K.E., Kim,Y.J., Zhou,Z., Hurtado,J., Kim,K.K., Pickard,R.T., and Kwon,B.S. (1993). Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J. Immunol.* 150, 771-781.
- Prasad,K.V., Cai,Y.C., Raab,M., Duckworth,B., Cantley,L., Shoelson,S.E., and Rudd,C.E. (1994). T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 2834-2838.
- Quill,H. and Schwartz,R.H. (1987). Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J. Immunol.* 138, 3704-3712.
- Raab,M., Cai,Y.C., Bunnell,S.C., Heyeck,S.D., Berg,L.J., and Rudd,C.E. (1995). p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3- kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-

- specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 8891-8895.
- Raulet,D.H. and Held,W. (1995). Natural killer cell receptors: the offs and ons of NK cell recognition. *Cell* *82*, 697-700.
- Razi-Wolf,Z., Freeman,G.J., Galvin,F., Benacerraf,B., Nadler,L., and Reiser,H. (1992). Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 4210-4214.
- Raziuddin,A., Longo,D.L., Mason,L., Ortaldo,J.R., and Murphy,W.J. (1996). Ly-49 G2+ NK cells are responsible for mediating the rejection of H-2b bone marrow allografts in mice. *Int. Immunol.* *8*, 1833-1839.
- Reay,P.A., Matsui,K., Haase,K., Wulfing,C., Chien,Y.H., and Davis,M.M. (2000). Determination of the relationship between T cell responsiveness and the number of MHC-peptide complexes using specific monoclonal antibodies. *J. Immunol.* *164*, 5626-5634.
- Reiser,H., Freeman,G.J., Razi-Wolf,Z., Gimmi,C.D., Benacerraf,B., and Nadler,L.M. (1992). Murine B7 antigen provides an efficient costimulatory signal for activation of murine T lymphocytes via the T-cell receptor/CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 271-275.
- Reth,M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* *338*, 383-384.
- Rock,F.L., Hardiman,G., Timans,J.C., Kastelein,R.A., and Bazan,J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 588-593.
- Russell,P.S., Chase,C.M., Winn,H.J., and Colvin,R.B. (1994). Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity. *J. Immunol.* *152*, 5135-5141.
- Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* *239*, 487-491.
- Salcedo,M., Diehl,A.D., Olsson-Alheim,M.Y., Sundback,J., Van Kaer,L., Karre,K., and Ljunggren,H.G. (1997). Altered expression of Ly49 inhibitory receptors on natural killer cells from MHC class I-deficient mice. *J. Immunol.* *158*, 3174-3180.
- Sayegh,M.H., Watschinger,B., and Carpenter,C.B. (1994). Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation* *57*, 1295-1302.
- Scheinman,R.I., Cogswell,P.C., Lofquist,A.K., and Baldwin,A.S., Jr. (1995). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* *270*, 283-286.
- Scheipers,P. and Reiser,H. (1998). Role of the CTLA-4 receptor in T cell activation and immunity. Physiologic function of the CTLA-4 receptor. *Immunol. Res.* *18*, 103-115.

- Schena,F.P. (1997). New insights into therapy with monoclonal antibodies in allograft transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant. 12 Suppl 1*, 55-58.
- Schneider,H., Cai,Y.C., Prasad,K.V., Shoelson,S.E., and Rudd,C.E. (1995). T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras. *Eur. J. Immunol. 25*, 1044-1050.
- Schwartz,R.H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell 71*, 1065-1068.
- Seaman,W.E., Sleisenger,M., Eriksson,E., and Koo,G.C. (1987). Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK- 1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J. Immunol. 138*, 4539-4544.
- Seino,K.I., Fukao,K., Muramoto,K., Yanagisawa,K., Takada,Y., Kakuta,S., Iwakura,Y., Van Kaer,L., Takeda,K., Nakayama,T., Taniguchi,M., Bashuda,H., Yagita,H., and Okumura,K. (2001). Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98*, 2577-2581.
- Sentman,C.L., Hackett,J., Jr., Kumar,V., and Bennett,M. (1989). Identification of a subset of murine natural killer cells that mediates rejection of Hh-1d but not Hh-1b bone marrow grafts. *J. Exp. Med. 170*, 191-202.
- Sentman,C.L., Olsson,M.Y., and Karre,K. (1995). Missing self recognition by natural killer cells in MHC class I transgenic mice. A 'receptor calibration' model for how effector cells adapt to self. *Semin. Immunol. 7*, 109-119.
- Shahinian,A., Pfeffer,K., Lee,K.P., Kundig,T.M., Kishihara,K., Wakeham,A., Kawai,K., Ohashi,P.S., Thompson,C.B., and Mak,T.W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science 261*, 609-612.
- Shelton,M.W., Walp,L.A., Basler,J.T., Uchiyama,K., and Hanto,D.W. (1992). Mediation of skin allograft rejection in scid mice by CD4+ and CD8+ T cells. *Transplantation 54*, 278-286.
- Sherman,L.A. and Chattopadhyay,S. (1993). The molecular basis of allorecognition. *Annu. Rev. Immunol. 11*, 385-402.
- Shi,F.D., Wang,H.B., Li,H., Hong,S., Taniguchi,M., Link,H., Van Kaer,L., and Ljunggren,H.G. (2000). Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat. Immunol. 1*, 245-251.
- Shuford,W.W., Klussman,K., Tritchler,D.D., Loo,D.T., Chalupny,J., Siadak,A.W., Brown,T.J., Emswiler,J., Raecho,H., Larsen,C.P., Pearson,T.C., Ledbetter,J.A., Aruffo,A., and Mittler,R.S. (1997). 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J. Exp. Med. 186*, 47-55.
- Skold,M. and Cardell,S. (2000). Differential regulation of Ly49 expression on CD4+ and CD4-CD8- (double negative) NK1.1+ T cells. *Eur. J. Immunol. 30*, 2488-2496.

- Slavik,J.M., Hutchcroft,J.E., and Bierer,B.E. (1999). CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol. Res.* *19*, 1-24.
- Slifka,M.K., Pagarigan,R.R., and Whitton,J.L. (2000). NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells. *J. Immunol.* *164*, 2009-2015.
- Smith,K.M., Wu,J., Bakker,A.B., Phillips,J.H., and Lanier,L.L. (1998). Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *J. Immunol.* *161*, 7-10.
- Songyang,Z., Shoelson,S.E., Chaudhuri,M., Gish,G., Pawson,T., Haser,W.G., King,F., Roberts,T., Ratnofsky,S., Lechleider,R.J., and . (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* *72* , 767-778.
- Soulillou,J.P., Vie,H., Moreau,J.F., Peyrat,M.A., and Blandin,F. (1983). Increased NK cell activity in rats rejecting heart allografts. *Transplantation* *36*, 726-727.
- Springer,T., Galfre,G., Secher,D.S., and Milstein,C. (1979). Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* *9*, 301-306.
- Stahl,P.D. and Ezekowitz,R.A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* *10*, 50-55.
- Stern,P., Gidlund,M., Orn,A., and Wigzell,H. (1980). Natural killer cells mediate lysis of embryonal carcinoma cells lacking MHC. *Nature* *285*, 341-342.
- Sykulev,Y., Cohen,R.J., and Eisen,H.N. (1995). The law of mass action governs antigen-stimulated cytolytic activity of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 11990-11992.
- Sykulev,Y., Joo,M., Vturina,I., Tsomides,T.J., and Eisen,H.N. (1996). Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity.* *4*, 565-571.
- Szot,G.L., Zhou,P., Sharpe,A.H., He,G., Kim,O., Newell,K.A., Bluestone,J.A., and Thistlethwaite,J.R., Jr. (2000). Absence of host B7 expression is sufficient for long-term murine vascularized heart allograft survival. *Transplantation* *69*, 904-909.
- Takeuchi,O. and Akira,S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.* *1*, 625-635.
- Tan,J.T., Whitmire,J.K., Ahmed,R., Pearson,T.C., and Larsen,C.P. (1999). 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J. Immunol.* *163*, 4859-4868.
- Teh,H.S. and Teh,S.J. (1997). High concentrations of antigenic ligand activate and do not tolerize naive CD4 T cells in the absence of CD28/B7 costimulation. *Cell Immunol.* *179*, 74-83.

- Teixeira,H.C. and Kaufmann,S.H. (1994). Role of NK1.1+ cells in experimental listeriosis. NK1+ cells are early IFN-gamma producers but impair resistance to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* *152*, 1873-1882.
- Thomas,K.R. and Capecchi,M.R. (1990). Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* *346*, 847-850.
- Thomson,A.W., Propper,D.J., Woo,J., Whiting,P.H., Milton,J.I., and Macleod,A.M. (1993). Comparative effects of rapamycin, FK 506 and cyclosporine on antibody production, lymphocyte populations and immunoglobulin isotype switching in the rat. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* *15*, 355-369.
- Tivol,E.A., Borriello,F., Schweitzer,A.N., Lynch,W.P., Bluestone,J.A., and Sharpe,A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* *3*, 541-547.
- Tortorella,D., Gewurz,B.E., Furman,M.H., Schust,D.J., and Ploegh,H.L. (2000). Viral subversion of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 861-926.
- Trambley,J., Bingaman,A.W., Lin,A., Elwood,E.T., Waitze,S.Y., Ha,J., Durham,M.M., Corbascio,M., Cowan,S.R., Pearson,T.C., and Larsen,C.P. (1999). Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection. *J. Clin. Invest* *104*, 1715-1722.
- Trinchieri,G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* *47*, 187-376.
- Trinchieri,G. (1995). Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. *Semin. Immunol.* *7*, 83-88.
- Trinchieri,G. (1998). Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int. Rev. Immunol.* *16*, 365-396.
- Trinchieri,G. and Santoli,D. (1978). Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J. Exp. Med.* *147*, 1314-1333.
- Truitt,K.E., Hicks,C.M., and Imboden,J.B. (1994). Stimulation of CD28 triggers an association between CD28 and phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells. *J. Exp. Med.* *179*, 1071-1076.
- Turka,L.A., Linsley,P.S., Lin,H., Brady,W., Leiden,J.M., Wei,R.Q., Gibson,M.L., Zheng,X.G., Myrdal,S., Gordon,D., and . (1992). T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 11102-11105.
- UNOS. 1999 Annual Report of the U.S. Scientific Registry of Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network: Transplant Data 1989-1998. 2-21-2000.
- Ref Type: Internet Communication

- Vales-Gomez,M., Reyburn,H.T., Erskine,R.A., Lopez-Botet,M., and Strominger,J.L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J.* *18*, 4250-4260.
- Valitutti,S., Muller,S., Cella,M., Padovan,E., and Lanzavecchia,A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* *375*, 148-151.
- Van Ewijk,W., Ron,Y., Monaco,J., Kappler,J., Marrack,P., Le Meur,M., Gerlinger,P., Durand,B., Benoist,C., and Mathis,D. (1988). Compartmentalization of MHC class II gene expression in transgenic mice. *Cell* *53*, 357-370.
- Vance,R.E., Jamieson,A.M., and Raulet,D.H. (1999). Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. *J. Exp. Med.* *190*, 1801-1812.
- Vance,R.E., Kraft,J.R., Altman,J.D., Jensen,P.E., and Raulet,D.H. (1998). Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J. Exp. Med.* *188*, 1841-1848.
- Vance,R.E., Tanamachi,D.M., Hanke,T., and Raulet,D.H. (1997). Cloning of a mouse homolog of CD94 extends the family of C-type lectins on murine natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* *27*, 3236-3241.
- Vella,J.P., Vos,L., Carpenter,C.B., and Sayegh,M.H. (1997). Role of indirect allorecognition in experimental late acute rejection. *Transplantation* *64*, 1823-1828.
- Vely,F., Olivero,S., Olcese,L., Moretta,A., Damen,J.E., Liu,L., Krystal,G., Cambier,J.C., Daeron,M., and Vivier,E. (1997). Differential association of phosphatases with hematopoietic co-receptors bearing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Eur. J. Immunol.* *27*, 1994-2000.
- Viola,A. and Lanzavecchia,A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* *273*, 104-106.
- Wagner,H. (2001). Toll meets bacterial cpg-dna. *Immunity.* *14*, 499-502.
- Waldmann,T.A., Dubois,S., and Tagaya,Y. (2001). Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity.* *14*, 105-110.
- Wang,B., Maile,R., Greenwood,R., Collins,E.J., and Frelinger,J.A. (2000). Naive CD8+ T cells do not require costimulation for proliferation and differentiation into cytotoxic effector cells. *J. Immunol.* *164*, 1216-1222.
- Wang,M., Ellison,C.A., Gartner,J.G., and HayGlass,K.T. (1998). Natural killer cell depletion fails to influence initial CD4 T cell commitment in vivo in exogenous antigen-stimulated cytokine and antibody responses. *J. Immunol.* *160*, 1098-1105.

- Ward,S.G. (1996). CD28: a signalling perspective. *Biochem. J.* *318 (Pt 2)*, 361-377.
- Waterhouse,P., Penninger,J.M., Timms,E., Wakeham,A., Shahinian,A., Lee,K.P., Thompson,C.B., Griesser,H., and Mak,T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science* *270*, 985-988.
- Wesche,H., Henzel,W.J., Shillinglaw,W., Li,S., and Cao,Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* *7*, 837-847.
- Whitmire,J.K. and Ahmed,R. (2000). Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 448-455.
- Williams,I.R. and Unanue,E.R. (1991). Characterization of accessory cell costimulation of Th1 cytokine synthesis. *J. Immunol.* *147*, 3752-3760.
- Williams,M.A., Trambley,J., Ha,J., Adams,A.B., Durham,M.M., Rees,P., Cowan,S.R., Pearson,T.C., and Larsen,C.P. (2000). Genetic characterization of strain differences in the ability to mediate CD40/CD28-independent rejection of skin allografts. *J. Immunol.* *165*, 6849-6857.
- Williams,M.J., Rodriguez,A., Kimbrell,D.A., and Eldon,E.D. (1997). The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J.* *16*, 6120-6130.
- Wilson,D.B. and Nowell,P.C. (1971). Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. V. Tempo and specificity of the proliferative response and the number of reactive cells from immunized donors. *J. Exp. Med.* *133*, 442-453.
- Winter,C.C., Gumperz,J.E., Parham,P., Long,E.O., and Wagtmann,N. (1998). Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J. Immunol.* *161*, 571-577.
- Wong,S., Freeman,J.D., Kelleher,C., Mager,D., and Takei,F. (1991). Ly-49 multigene family. New members of a superfamily of type II membrane proteins with lectin-like domains. *J. Immunol.* *147*, 1417-1423.
- Wu,J., Cherwinski,H., Spies,T., Phillips,J.H., and Lanier,L.L. (2000). DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J. Exp. Med.* *192*, 1059-1068.
- Wu,J., Song,Y., Bakker,A.B., Bauer,S., Spies,T., Lanier,L.L., and Phillips,J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* *285*, 730-732.
- Wu,Y. and Liu,Y. (1994). Viral induction of co-stimulatory activity on antigen-presenting cells bypasses the need for CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr. Biol.* *4*, 499-505.

- Yamada,A., Kishimoto,K., Dong,V.M., Sho,M., Salama,A.D., Anosova,N.G., Benichou,G., Mandelbrot,D.A., Sharpe,A.H., Turka,L.A., Auchincloss,H., Jr., and Sayegh,M.H. (2001). CD28-independent costimulation of T cells in alloimmune responses. *J. Immunol.* *167*, 140-146.
- Yang,X.F., Weber,G.F., and Cantor,H. (1997). A novel Bcl-x isoform connected to the T cell receptor regulates apoptosis in T cells. *Immunity.* *7*, 629-639.
- Yokoyama,S., Staunton,D., Fisher,R., Amiot,M., Fortin,J.J., and Thorley-Lawson,D.A. (1991). Expression of the Blast-1 activation/adhesion molecule and its identification as CD48. *J. Immunol.* *146*, 2192-2200.
- Yokoyama,W.M., Daniels,B.F., Seaman,W.E., Hunziker,R., Margulies,D.H., and Smith,H.R. (1995). A family of murine NK cell receptors specific for target cell MHC class I molecules. *Semin. Immunol.* *7*, 89-101.
- Yokoyama,W.M. and Seaman,W.E. (1993). The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu. Rev. Immunol.* *11*, 613-635.
- Young,N. and Speck,B. (1984). Antithymocyte and antilymphocyte globulins: clinical trials and mechanism of action. *Prog. Clin. Biol. Res.* *148*, 221-226.
- Yu,Y.Y., George,T., Dorfman,J.R., Roland,J., Kumar,V., and Bennett,M. (1996). The role of Ly49A and 5E6(Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine natural killer cells against normal T cell blasts. *Immunity.* *4*, 67-76.
- Yu,Y.Y., Kumar,V., and Bennett,M. (1992). Murine natural killer cells and marrow graft rejection. *Annu. Rev. Immunol.* *10:189-213*, 189-213.
- Zheng,X.X., Sayegh,M.H., Zheng,X.G., Li,Y., Linsley,P.S., Peach,R., Borriello,F., Strom,T.B., Sharpe,A.H., and Turka,L.A. (1997). The role of donor and recipient B7-1 (CD80) in allograft rejection. *J. Immunol.* *159*, 1169-1173.
- Zhou,P., Szot,G.L., Guo,Z., Kim,O., He,G., Wang,J., Grusby,M.J., Newell,K.A., Thistlethwaite,J.R., Bluestone,J.A., and Alegre,M.L. (2000). Role of STAT4 and STAT6 signaling in allograft rejection and CTLA4-Ig- mediated tolerance. *J. Immunol.* *165*, 5580-5587.
- Zijlstra,M., Auchincloss,H., Jr., Loring,J.M., Chase,C.M., Russell,P.S., and Jaenisch,R. (1992). Skin graft rejection by beta 2-microglobulin-deficient mice. *J. Exp. Med.* *175*, 885-893.
- Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1974). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* *251*, 547-548.
- Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1997). The discovery of MHC restriction. *Immunol. Today* *18*, 14-17.

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Klaus Pfeffer möchte ich herzlich danken für seine hervorragende Betreuung, für seine Unterstützung auch während und nach Rückschlägen, für sein stets offenes Ohr für neue Ideen, und für seine Geduld.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hermann Wagner, Ph.D., der mir die Anfertigung dieser Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene ermöglichte.

Dr. Yolande Chvatchko danke ich für die freundliche Überlassung von anti-NK1.1-AK.

Allen „Peffers“ möchte ich herzlich danken für den hervorragenden Teamgeist, die stete Hilfsbereitschaft, die technische und moralische Unterstützung und viele anregende Diskussionen.

Insbesondere bei Robert Endres und Judith Alferink bedanke ich mich für hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

Niko Zantl und Hans Neubauer danke ich für die unersetzliche Unterstützung und Hilfe in der Anfangszeit.

Ein großes Dankeschön an Nicole Chambron für die angenehme Zusammenarbeit und die Ausdauer in langen Nächten am Durchflußzytometer.

Bei Stefan Maier, Klaus Gerauer, Norbert Hüser und nochmals bei Nicole Chambron möchte ich mich herzlich bedanken für das unermüdliche Transplantieren.

Ich bedanke mich bei Heinrich Flaswinkel für seine stets prompte Hilfe bei technischen Problemen am Durchflußzytometer.

Frau Dr. Martina Haasemann danke ich für ihre kompetente und engagierte Organisation des Graduiertenkollegs.

Ich bedanke mich bei Frau Raymonde Busch für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Transplantat-Überlebenszeiten.

Ein großes Dankeschön an Annette Schaub und Thorsten Buch für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Mein größter Dank gilt meiner Familie: Meinen Eltern für Ihre Unterstützung und Ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten, meiner Schwester Michèle dafür, dass eigentlich sie den Anstoß für diese Arbeit gegeben hat, und meinem Bruder Jan-Erik dafür, dass er immer wieder Verständnis hatte, wenn ich in den letzten Jahren wenig Zeit für ihn hatte.