

Funktionale Bedeutung des  
Chemokinrezeptors 4 (CCR 4)  
bei der Abstoßung von  
heterotopen Herztransplantaten  
in der Maus

Norbert Hüser



Chirurgische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. R. Siewert)

Funktionale Bedeutung des Chemokinrezeptors 4 (CCR4)  
bei der Abstoßung von heterotopen Herztransplantaten  
in der Maus

Norbert Hüser

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. C.- D. Heidecke  
Ernst-Moritz-Armdt-Universität Greifswald
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann
3. Univ.-Prof. Dr. V. Erfle

Die Dissertation wurde am 31.3.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.12.2003 angenommen.

Funktionale Bedeutung des  
Chemokinrezeptors 4 (CCR 4)  
bei der Abstoßung von  
heterotopen Herztransplantaten  
in der Maus

Norbert Hüser

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	9
1.1	Einführung	9
1.2	Klassifikation der Abstoßung	10
1.2.1	Hyperakute Abstoßung	10
1.2.2	Akute Abstoßung	11
1.2.3	Chronische Abstoßung	12
1.3	Nichtimmunologische Risiken des chronischen Transplantatversagens	13
1.3.1	Spenderbedingte nichtimmunologische Risikofaktoren	14
1.3.2	Empfängerbedingte nichtimmunologische Risikofaktoren	14
1.4	Immunologie des akuten und chronischen Transplantatversagens	16
1.4.1	Immunologische Risikofaktoren der chronischen Abstoßung	16
1.4.2	Mechanismen des akuten und chronischen Transplantatversagens	18
1.4.2.1	Lymphozyten, mononukleäre Phagozyten und Entzündungszellen	19
1.4.2.2	T-Lymphozyten und Antigenpräsentation	21
1.4.2.3	AG-Erkennung, T-Zellaktivierung, Kostimulation und Chemokine	22
1.4.2.4	Interaktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren	25
1.4.2.5	Der CCR4-Rezeptor und seine Liganden	27
1.5	Das Galliumnitratmodell der chronischen Abstoßung	28
1.6	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	29
<b>2</b>	<b>Material und Methodik</b>	32
2.1	Bezugsquellennachweis	32
2.1.1	Versuchstiere	32

2.1.2	Chemikalien	32
2.1.3	Radiochemikalien	33
2.1.4	Enzyme	33
2.1.5	Reagentien und Verbrauchsmaterial	34
2.1.6	Geräte	34
2.1.7	Operationsinstrumentarium/-Material	35
2.2	Primer	36
2.3	Stammlösungen und Puffer	36
2.4	Heterotope Herztransplantation in der Maus	37
2.4.1	Tiermodell	37
2.4.2	Genehmigung der Tierversuche	39
2.4.3	Tierspezies und Tierhaltung	39
2.4.4	Anästhesie	39
2.4.5	Operationen	40
2.4.5.1	Spenderoperation	40
2.4.5.2	Empfängeroperation	41
2.4.5.3	Entnahme der Transplantate	42
2.4.6	Medikamentöse Therapie	43
2.4.6.1	Allgemeine Medikation	43
2.4.6.2	Immunsuppression	43
2.4.7	Abstoßungsdiagnostik	44
2.4.7.1	Die Fingerpalpation	44
2.4.7.2	Die diagnostische Laparotomie	45
2.5	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen der Organe	45
2.5.1	Die Labormethoden zur Aufbereitung der Organe	45
2.5.2	Die konventionellen Färbungen	46
2.5.3	Die immunhistochemischen Färbungen	46
2.6	Die Abstoßungsklassifikation nach Billingham	48
2.7	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	49
2.7.1	Agarose Gelelektrophorese	49

2.7.2	RNS-Isolierung	50
2.7.3	Ribonuklease Protektion Assay	51
2.7.4	Reverse Transkriptase PCR	56
2.7.4.1	cDNS-Synthese	57
2.7.4.2	Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR	58
2.8	Statistik	59
2.9	Gruppeneinteilung	59
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
3.1	Auswirkungen des CCR4-Defekts in vivo	61
3.1.1	Auswirkungen des CCR4-Defekts im akuten Modell	61
3.1.2	Auswirkungen des CCR4-Defekts nach vollallogener Transplantation im chronischen Modell	62
3.1.3	Zusammenfassung der Überlebenskinetik in den Gruppen	66
3.2	Auswirkungen des CCR4-Defekts ex vivo	67
3.2.1	Untersuchung der Chemokin- bzw. CCR4-Expression in Herztransplantaten mittels RT-PCR	67
3.2.2	Untersuchung von Zytokin- und Chemokinexpressionen in Herztransplantaten mittels Ribonuklease Protektion Assay	68
3.2.3	Konventionelle Histologie	70
3.2.4	Immunhistochemie	74
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>89</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AG	Antigen
AK	Antikörper
APZ	Antigen präsentierende Zelle
B220	CD45R; auf B-Lymphozyten in der Maus
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCR4 <sup>-/-</sup>	Maus mit homozygotem Gendefekt für den Chemokinrezeptor CCR4
CD	Cluster of differentiation (Oberflächenmarker)
CMV	Cytomegalievirus
cDNS	Komplementäre DNS (DNS-Kopie der RNS)
CsA	Cyclosporin A
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTH	delayed type hypersensitivity
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
EtOH	Ethanol
Gr-1	CD97; auf Granulozyten in der Maus
GN	Galliumnitrat
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser
HLA	human leucocyte antigen
HTx	Herztransplantation
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kb	Kilobasenpaare

## Abkürzungsverzeichnis

---

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LD	Letalitätsdosis
M	Mol
Mac-1	CD11b; auf myeloiden Zellen (v.a. Granulozyten und Makrophagen) und NK-Zellen in der Maus
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
mRNS	messenger Ribonukleinsäure (Boten RNS)
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OKT3	Anti-CD3-Antikörper
PBS	Phosphat gepuffertes Salz
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RPA	Ribonuklease Protektion Assay
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helferzelle (CD4)
Thy-1	CDw90; auf Thymozyten und T-Lymphozyten in der Maus
U/min	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Einführung

Die Organtransplantation stellt in der modernen Medizin ein mittlerweile weit verbreitetes und gut etabliertes Behandlungsverfahren verschiedener Krankheiten dar. So ist beispielsweise die Nierentransplantation heute Methode der Wahl, um dem terminal niereninsuffizienten Patienten die chronisch maschinelle Blutreinigung zu ersparen. Damit wird dem Patienten nicht nur ein Stück Lebensqualität zurückgegeben, es können auch die mit der Dialyseabhängigkeit verbundenen sehr hohen Kosten gesenkt werden <sup>87</sup>.

Im Laufe der letzten Jahre wurden die kurzfristigen Resultate nach einer Nierentransplantation deutlich verbessert. Die Ein-Jahres-Transplantationsüberlebensraten lagen für die Leichenspende bei über 60 Prozent und bei 90 bis 95 Prozent bei Transplantaten von Lebendspendern <sup>64; 188</sup>. Dies ist nicht zuletzt der Einführung sehr effektiver, immunsuppressiver Medikamente wie zum Beispiel dem Cyclosporin A (CsA) oder OKT3 zu verdanken. Verbesserte operative Techniken, wirkungsvolleres medikamentöses und nichtmedikamentöses Vorgehen gegen auftretende postoperative Infektionen haben ebenfalls dazu beigetragen. Im Gegensatz dazu konnte keine wesentliche Verbesserung der Langzeitergebnisse festgestellt werden. Verschiedene Untersuchungen über einen Zeitraum von 20 Jahren nach Organtransplantation zeigen nahezu unveränderte Resultate im Abstoßungsverhalten der Transplantate <sup>64; 188</sup>. Nach fünf Jahren funktionieren noch etwa 60 Prozent, nach zehn Jahren 30 bis 40 Prozent der Nierentransplantate.

Die chronische Transplantatabstoßung ist heute die Hauptursache für den späten Transplantatverlust <sup>190</sup>. Darüber hinaus gelten kardiovaskuläre Probleme mit Todesfolge oder Infektionen nach erfolgter Transplantation sowie ein ablehnendes Verhalten des Patienten gegenüber einem festgelegten Therapieschema (Noncompliance) als weitere wichtige Gründe.

Im Verlauf der chronischen Abstoßung kommt es zu einer Schädigung der Gefäßwand des Transplantats, die zu chronischen Reparaturvorgängen mit konsekutiver Transplantatvaskulopathie führt. Nach derzeitigem Stand der Erkenntnisse sind hierbei unter anderem

T-Zellen, infiltrierende Monozyten und Makrophagen sowie deren lösliche Produkte – Zytokine und Chemokine – für die Unterhaltung dieser Vorgänge verantwortlich. Zahlreiche Untersuchungen, zum einen im Rahmen von Tier- und Zellkulturmodellen, zum anderen anhand klinischer Studien, deuten darauf hin, dass Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Chemokine bzw. deren spezifische Rezeptoren eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Transplantatvaskulopathie spielen.

Mit dem Einfluss eines bestimmten Chemokinrezeptors, dem CCR4-Rezeptor, und dessen Liganden auf akute sowie chronische vaskuläre und interstitielle Veränderungen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Für diese Untersuchungen erweist sich die heterotope Herztransplantation in der Maus als das am besten geeignete Tiermodell.

## **1.2 Klassifikation der Abstoßung**

Die Einteilung der Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation stützt sich im Wesentlichen auf die histopathologischen Veränderungen. Hierbei werden weniger die immunologischen Effektormechanismen berücksichtigt. Nach dieser Klassifikation lassen sich drei Formen der Abstoßung unterscheiden, die hyperakute, die akute und die chronische. Es darf jedoch nicht der Eindruck entstehen, es handle sich um zeitlich nacheinander auftretende Phasen der Abstoßung. Während die hyperakute Form der Abstoßung sehr schnell nach der Transplantation in Erscheinung tritt, ist es durchaus möglich, dass akute und chronische Rejektion parallel verlaufen. Daher wird der jeweiligen Abstoßungsreaktion mehr ein histologisches Bild denn ein bestimmter Zeitpunkt zugeordnet.

### **1.2.1 Hyperakute Abstoßung**

Bei der hyperakuten Abstoßung handelt es sich um ein Geschehen, welches unmittelbar – innerhalb von Minuten bis Stunden – nach der Reperfusion einsetzt. Bereits existierende Antikörper bewirken eine gegen das Gefäßsystem des Transplantats gerichtete Reaktion. Nach Bindung an die Endothelzellen wird über die Aktivierung der Komplementkaskade ein initialer Gefäßschaden hervorgerufen. Über die Freisetzung multipler Mediatoren und die Freilegung subendothelialer Strukturen wird die intravasale Gerinnung gefördert, die

schließlich in einer Thrombosierung und ischämischen Schädigung des Transplantates gipfelt<sup>57</sup>.

Ein solcher Mechanismus wurde erstmals 1964 postuliert<sup>142</sup>. In dieser Anfangsphase der Organtransplantation wurde die hyperakute Abstoßung oftmals durch vorbestehende Antikörper ausgelöst. Vermutlich sind diese bereits in vivo existierenden Antikörper Resultat vorausgegangener Reaktionen des Organismus mit Kohlenhydratantigenen verschiedener Mikroorganismen der Darmflora. Als Beispiel sei das ABO-Blutgruppensystem genannt, dessen Antigene auch auf den Endothelzellen und somit im transplantierten Organ exprimiert werden. Auch direkte Reaktionen mit Antigenen des MHC-Komplexes sind möglich.

Die hyperakute Abstoßung der Leber ist weniger häufig dokumentiert als die der Niere. Als möglicher Schutzmechanismus wird deren sinusoidaler Gefäßaufbau genannt, der gegenüber einer Thrombosierung im Gegensatz zur Gefäßarchitektur der Niere weniger empfindlich sei<sup>177</sup>. Durch ein heutzutage routinemäßiges Cross-matching bzw. die Durchführung von Kreuzproben zwischen Spenderlymphozyten und Empfängerserum kann die hyperakute Form der Abstoßung praktisch immer vermieden werden.

### 1.2.2 Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung ist die häufigste Ursache für den Transplantatverlust im Zeitraum zwischen dem 5. und 15. postoperativen Tag<sup>154</sup>. Ihr Erscheinungsbild ist variabler als das der hyperakuten Abstoßung, was zum Teil durch die individuelle Reaktion eines Transplantatempfängers auf immunsuppressive Medikation, auftretende Infektionen oder aber einen unterschiedlichen Grad des Matching von Spender und Empfänger bedingt sein könnte<sup>177</sup>.

Sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität spielen bei der akuten Abstoßung eine entscheidende Rolle. Man kann eine vaskuläre von einer zellulären, parenchymatösen Form der Abstoßung unterscheiden. Im Rahmen der akuten vaskulären Abstoßung kommt es zu Einzelzellnekrosen des Endothels im Transplantat. Zelluläre wie humorale Faktoren – in Form von IgG-Antikörpern gegen Alloantigene der Gefäßendothelien mit konsekutiver Aktivierung des Komplementsystems – führen zur Gefäßschädigung. T-Lymphozyten

können ebenfalls mit MHC-Molekülen oder anderen Antigenen des Endothels in Kontakt treten und über direkte Zytolyse oder zytokinvermittelte Rekrutierung verschiedener Entzündungszellen zum Prozess der histologisch als Vaskulitis bzw. Endothelialitis imponierenden Abstoßung beitragen <sup>141</sup>.

Über lymphozyten- und makrophagenhaltige Infiltrate des Transplantates kommt es zur Nekrose von Parenchymzellen. Vermittelt durch aktivierte Makrophagen oder direkt durch zytotoxische T-Zellen (CTL) oder auch „Natürliche Killerzellen“ (NK-Zellen) werden deren Zielzellen lysiert <sup>54; 72</sup>. In der Niere scheinen die Tubulusepithelien erster Angriffspunkt zu sein, im weiteren Verlauf kommt es zur peritubulären und interstitiellen Infiltration des Spenderorgans <sup>175</sup>. In der Leber zeigen sich unterschiedlich ausgeprägte Kombinationen von Entzündung im Portalfeld, Zerstörung von Gallengängen und venöser Endothelialitis <sup>178</sup>. Morphologisches Korrelat akut abgestoßener Herztransplantate sind perivaskuläre und endotheliale, bei starker Abstoßungsreaktion auch interstitielle Infiltrate von Lymphozyten und Makrophagen <sup>19</sup>.

### 1.2.3 Chronische Abstoßung

Der Pathomechanismus der chronischen Abstoßung ist bis heute noch nicht voll verstanden. Tatsächlich ist sie aber hauptsächlicher Grund des späten Transplantatversagens. In der Vergangenheit wurde der Begriff der chronischen Abstoßung – wohl nicht zuletzt wegen mangelnden Wissens über deren Entstehung – sehr weiträumig gefasst. 1992 hat die „Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs“ eine akzeptable Definition vorgetragen <sup>145</sup>. Hiernach wird die Diagnose „chronische Abstoßung“ basierend auf histomorphologischen Charakteristika des Biopsats und den klinischen Beobachtungen einer allmählich abnehmenden Transplantatfunktion gestellt.

Beim Herzen erkennt man die progredient zunehmende Dysfunktion an einem Leistungsabfall des Patienten, verbunden mit einer Senkung des Blutdrucks, subfebrilen Temperaturen und Herzrhythmusstörungen wie etwa supraventrikulären Extrasystolen oder ventrikulären Tachykardien <sup>201</sup>. Bei Lebertransplantaten zeigen sich ein Anstieg der Transaminasen und des Bilirubins. Klinische Parameter des chronischen Nierenversagens sind er-

höhte Kreatininwerte und die Entwicklung einer Proteinurie, verbunden mit einem renal bedingten Bluthochdruck. Auftreten können diese Erscheinungen bereits relativ kurz nach der Transplantation, wesentlich deutlicher manifestieren sie sich jedoch etwa drei bis fünf Jahre nach Transplantation <sup>143</sup>.

Letztendlich gesichert werden kann die chronische Abstoßung jedoch nur durch eine Transplantatbiopsie mit anschließend histologischer Untersuchung. Ein allgemein morphologisches Kriterium zeigt sich in der Obliteration luminaler Strukturen des Transplantats. So ist die allogene bedingte Herzvaskulopathie – eine obliterative Gefäßerkrankung – häufigste Ursache des späten Transplantatsverlust <sup>193</sup>. Eben solche Phänomene finden sich in der Lunge – in Form bronchialer Obstruktionen – und in chronisch abgestoßenen Lebertransplantaten, zu sehen an der Reduktion von Gallengängen <sup>145</sup>, dem „vanishing bile duct syndrome“. Die vier entscheidenden histomorphologischen Korrelate des chronischen Nierenversagens sind ebenfalls proliferative Gefäßveränderungen, daneben Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophien <sup>191</sup>. All diese Veränderungen münden schließlich in einen bindegewebigen Ersatz der untergegangenen Strukturen.

In Einteilungen wie der Banff-Klassifikation wird die chronische Abstoßung der Niere allgemein den chronisch allogenen bedingten Nephropathien zugeordnet <sup>179</sup>. Mechanistisch wird heute davon ausgegangen, dass es sich bei den geschilderten erkennbaren pathologischen Veränderungen um das Ergebnis sowohl immunologischer als auch nichtimmunologischer Vorgänge handelt <sup>17; 192</sup>. Nach einer kürzeren Beleuchtung möglicher Risikofaktoren nicht-immunologischer Art soll im Folgenden explizit die Interaktion immunkompetenter Zellen herausgearbeitet werden, um ein Verständnis der immunologischen Vorgänge im Rahmen der akuten sowie chronischen Abstoßung zu gewinnen.

### **1.3 Nichtimmunologische Risiken des chronischen Transplantatversagens**

Obwohl die genauen pathologischen Vorgänge, die schließlich im chronischen Transplantatversagen gipfeln, noch nicht bekannt sind, lassen sich doch zahlreiche Risikofaktoren aufzeigen. Um eine wiederholte Aufzählung jener Faktoren für jedes der heute transplantationsfähigen Organe zu vermeiden und in anbetracht der klinischen Relevanz, die vor

allem der Nierentransplantation zukommt, sollen im Folgenden Risiken des chronischen Transplantatversagens der Niere beleuchtet werden (*Abb.1*). Bei den nichtimmunologischen Risikofaktoren lassen sich spender- und empfängerbedingte Aspekte unterscheiden.

### 1.3.1 Spenderbedingte nichtimmunologische Risikofaktoren

Einen bedeutenden Einfluss auf das Langzeitüberleben des Transplantats hat das Alter des Spenders<sup>134</sup>. Es lassen sich in Studien deutlich schlechtere längerfristige Transplantationserfolge aufzeigen, wenn die Organe von Spendern stammen, die das 50. Lebensjahr bereits überschritten haben bzw. die jünger als zehn Jahre alt sind<sup>64; 160</sup>. Diese Resultate lassen sich allem Anschein nach auf die Anzahl der funktionstüchtigen Nephrone und die im höheren Alter durchschnittlich häufiger auftretenden vaskulären Erkrankungen des Spenders zurückführen. Außerdem kann sich die Transplantation kleiner Nieren unter den neuen metabolischen Bedingungen im erwachsenen Empfänger nachteilig auswirken. Dennoch sollte darauf hingewiesen werden, dass nicht in allen Untersuchungen zwischen Spenderalter und Transplantatüberleben eine signifikante Abhängigkeit auftrat<sup>3; 151</sup>.

Die Gründe für die in einigen Untersuchungen aufgezeigten nachteiligen Effekte bei der Verwendung weiblicher Spendernieren für männliche Empfänger lassen sich wohl ebenfalls auf ein Missverhältnis funktionstüchtiger Nephrone zurückführen<sup>28; 92</sup>.

Bei einem Vergleich von Lebendspendern im Verhältnis zu Organentnahmen hirntoter Spender zeigt sich ein erhöhtes Risiko für den späten Transplantatverlust bei Verwendung von Organen toter Patienten<sup>125</sup>. Womöglich spielen hierbei bestimmte Zytokine sowie Katecholamine eine Rolle, die nach dem Hirntod vermehrt produziert werden und einen gewebeschädigenden Einfluss ausüben<sup>87</sup>.

### 1.3.2 Empfängerbedingte nichtimmunologische Risikofaktoren

Hier sei nochmals das Problem der Größendiskrepanz der Organe von Spender und Empfänger angesprochen. In tierexperimentellen Studien führten verringerte Nierenvolumina – teilweise chirurgisch induziert – zu glomerulärer Hypertension und der Ent-

wicklung von Glomerulosklerose, systemischem Bluthochdruck und schließlich dem späten Nierenversagen<sup>27; 93</sup>. Über die Hyperfiltration in den Nephronen werden die glomerulären und vaskulären Veränderungen herbeigeführt. Viele der histologischen Zeichen glomerulärvasculärer Schädigungen lassen sich ebenfalls in allogenen Langzeittransplantaten wieder finden, was die Hyperfiltration als einen Pathomechanismus des späten Transplantatversagens vermuten lässt.

Ein zweites Problem stellt der verzögerte Funktionsbeginn der transplantierten Organe dar. Zahlreiche Analysen zeigen diesbezüglich einen negativen Effekt sowohl auf das Kurzzeit- als auch das Langzeitüberleben der Organe<sup>104</sup>. Aber auch in diesem Punkt gehen die Meinungen auseinander. So konnte in einer Studie für den späten Funktionsbeginn des Organs kein eindeutiger Einfluss auf die Entwicklung einer chronischen Abstoßung aufgezeigt werden. Definitionsgemäß waren Patienten mit verzögertem Funktionsbeginn innerhalb der ersten Woche nach Transplantation weiterhin an die Dialyse gebunden, außerdem blieben die Kreatininwerte zunächst unverändert hoch<sup>114</sup>.

Als große Risiken eines späten Organversagens werden auch Transplantationen an Patienten mit Diabetes mellitus, Hyperlipidämie oder Hypertonie gewertet<sup>143</sup>. Auf Grund arteriosklerotischer und glomerulärer Veränderungen im Sinne einer diabetischen Nephropathie müssen Diabetespatienten als potentiell gefährdet eingestuft werden. Öfter treten aber Hyperlipidämien nach Nierentransplantation auf, die gemeinsam mit einer starken Proteinurie bzw. mit einer vorbestehenden Hypertonie in Erscheinung treten können<sup>103</sup>. Immunsuppressive Medikamente wie Cyclosporin A oder Steroide nehmen zusätzlich negativen Einfluss auf den Fettstoffwechsel. Als histologisches Korrelat der chronischen Abstoßung lassen sich durch die Hyperlipidämie induzierte vaskuläre Veränderungen im Sinne einer Arteriosklerose erkennen<sup>87</sup>.

Schließlich sei der mögliche Einfluss einer Virusinfektion auf die Entwicklung einer chronischen Rejektion erwähnt. Dabei scheint sich die Transplantation eines zytomegaliepositiven Organs (CMV-positiv) in einen CMV-negativen Empfänger am stärksten auszuwirken. Obwohl ein direkter Einfluss des Virus auf die Genese des späten Transplantatversagens nicht allgemein akzeptiert scheint, wird doch als Pathomechanismus eine vom Virus induzierte Endothelialitis vermutet, die über eine anschließend stattfindende Gefäßlä-

sion letztlich zu vaskulären Veränderungen mit den typischen Zeichen der chronischen Abstoßung führt <sup>125</sup>.

<p>Spenderbedingte nichtimmunologische Faktoren</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Alter des Spenders</li><li>- Geschlecht</li><li>- Vaskuläre Vorerkrankungen</li><li>- Explantationszeitpunkt</li></ul> <p>Empfängerbedingte nichtimmunologische Faktoren</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Verzögerte Transplantatfunktion</li><li>- Größenunterschiede der Organe (mit Hyperfiltration)</li><li>- Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus</li><li>- CMV-Infektionen</li></ul> <p>Immunologische Faktoren</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Anzahl / Intensität akuter Rejektionsphasen</li><li>- Immunsuppression</li><li>- HLA-matching</li></ul>
---

*Abb.1: Risikofaktoren des späten Transplantatversagens, modifiziert nach Heidenreich et al.*

## **1.4 Immunologie des akuten und chronischen Transplantatversagens**

### **1.4.1 Immunologische Risikofaktoren der chronischen Abstoßung**

In der Transplantation auftretende akute Phasen der Abstoßung stellen für einige Autoren ein Hauptrisiko für den späten Transplantatverlust dar <sup>3; 13; 117; 126; 148; 189</sup>. Sowohl die Anzahl der Episoden als auch deren Intensität – gemessen anhand klinischer Parameter wie etwa der Kreatininanstieg im Serum nierentransplantierte Patienten – nehmen negativen Einfluss auf die Langzeitresultate <sup>56; 125; 187</sup>. Dabei korrelieren mehrere starke Abstoßungsphasen besonders stark mit dem späteren Transplantatverlust <sup>195</sup>. Zu berücksichtigen ist wohl auch der Zeitpunkt, in denen eine akute Abstoßung im Organ abläuft; so kann innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation selbst eine stärkere akute Abstoßungskrise das Ri-

siko der Entwicklung einer chronischen Rejektion nur geringfügig erhöhen. Im Gegensatz dazu führten akute Abstoßungsreaktionen nach drei Monaten – und vor allem nach 24 Monaten – zu einem deutlich höheren Risiko im Hinblick auf den späten Transplantatverlust<sup>125</sup>.

Einige Autoren sehen dagegen keinerlei Beeinflussung der Langzeitresultate durch vorher abgelaufene und mit Immunsuppressiva erfolgreich bekämpfte akute Phasen der Abstoßung<sup>100; 198</sup>, obwohl diese initial einen Endothelschaden mit anschließender chronischer Vaskulopathie verursachen – ein heute allgemein anerkannter Pathomechanismus des chronischen Transplantatversagens. Letztlich bleibt ungeklärt, ob durch die stattfindenden akuten Abstoßungen strukturelle Läsionen induziert werden, die sich auch nach dem Wegfall des primären Immungeschehens progredient auf den späten Transplantatverlust auswirken – beispielsweise über die bereits erwähnte Hyperfiltration in den verbleibenden funktionstüchtigen Nephronen – oder ob die chronischen Vorgänge ebenso wie die akuten Abstoßungsepisoden im Rahmen immunologischer Reaktionen ablaufen.

Eine zu geringe oder suboptimal dosierte Immunsuppression geht eindeutig mit einem erhöhten Risiko eines späten Transplantationsverlustes einher<sup>147</sup>. In diesem Zusammenhang scheint die Noncompliance der Patienten eine ernstzunehmende Rolle zu spielen. Ablehnung gegenüber einer genau vorgeschriebenen Medikation beeinflusst sowohl Lebensqualität als auch die Langzeiterfolge transplantierte Organe. Am stärksten wirkt sich laut zahlreicher Untersuchungen das Alter des Patienten auf eine postoperative Noncompliance aus<sup>83</sup>, weniger scheinen Faktoren wie Geschlecht, Erziehung oder Beruf der Patienten eine Rolle zu spielen. Aber auch durch den Einsatz neuer Immunsuppressiva konnten trotz verbesserter Kurzzeitüberlebensraten langfristig noch keine Erfolge erzielt werden. Dies könnte auf akute Abstoßungsreaktionen zurückzuführen sein, die früher zu schnellem Abstoßungsverhalten geführt hätten, heute aber durch potente Immunsuppressiva unterdrückt werden und somit einen Patientenpool generieren, der empfänglich ist für das Entstehen eines späten Transplantatversagens<sup>128</sup>.

Unter HLA-Typisierung versteht man die Bestimmung des individuellen Musters der MHC-Allele, über die jede Person verfügt. Dabei stellt die HLA-Übereinstimmung eines von mehreren Vergabekriterien bei der Auswahl eines geeigneten Empfängers für ein bestimmtes Transplantat dar und scheint nach jüngsten Untersuchungen nicht nur die Häufigkeit akuter Abstoßungen positiv zu beeinflussen, sondern auch Auswirkungen auf die

Langzeiterfolge zu haben<sup>134</sup>. Der Grad der HLA-Identität war nicht in allen Studien als wichtige Einflussgröße auf den späten Transplantatverlust festgestellt worden<sup>3; 88</sup>, zudem ist es bei einer positiven Korrelation von HLA-Mismatch und dem Auftreten akuter Abstoßungsreaktionen schwierig, eine mangelnde Identität der HLA-Antigene auch für die chronische Abstoßung verantwortlich zu machen<sup>207</sup>. Eine so genannte „Full-House-Konstellation“ – das heißt eine absolute Übereinstimmung von HLA-A, -B und -DR-Loci bei Spender und Empfänger – wirkt sich positiv auf das Langzeitüberleben des Transplantates aus. So sind bei Organen mit vollständiger HLA-Übereinstimmung nach drei Jahren noch 20 Prozent mehr funktionstüchtig als bei solchen mit sechs Mismatches<sup>207</sup>.

Die Pathomechanismen, die bei mangelnder HLA-Identität im Empfängerorganismus zur Abstoßung führen, sind immunologischer Art. Sie sollen im Folgenden – unter Einbeziehung der beteiligten Zellen und ihrer Mediatoren mit besonderem Augenmerk auf die Entwicklung chronischer Abstoßungsprozesse – genauer beleuchtet werden.

### 1.4.2 Mechanismen des akuten und chronischen Transplantatversagens

Die Immunantwort gegen Transplantate kann sowohl vom zellulären als auch vom humoralen Typ sein. Bei der zellulären Immunreaktion treten zum einen spezifisch wirksame T-Zell-vermittelte Prozesse in Erscheinung, zum anderen finden weniger spezifische Antworten durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen statt. An den humoral vermittelten Immunreaktionen sind sowohl gering spezifische, natürliche Antikörper – meist durch den IgM-Typ repräsentiert – sowie hochspezifische Antikörper verschiedener Iso-typen beteiligt – meist vom IgG-Typ - die unterschiedliche Funktionen wie Opsonisierung antigentragender Zielstrukturen, Komplementaktivierung, ADCC sowie die Aktivierung basophiler wie eosinophiler Granulozyten ausüben können. Diese genannten Mechanismen können alle als potente Effektoren an der Reaktion gegen das Allotransplantat mitwirken, wengleich die zellvermittelte Immunantwort bei der Abstoßung transplantierter Organe eine größere Rolle einzunehmen scheint<sup>18; 190</sup>.

Viele der in den letzten Jahren durchgeführten Studien zur Klärung der Mechanismen immunologischer Reaktionen gegen Fremdgewebe versuchten zu erfassen, welche Rolle den T-Zellen und ihrer zwei großen Subpopulationen zukommt, den CD4 und CD8-Zellen<sup>72; 185</sup>.

Danach scheint die Abstoßung hauptsächlich durch CD4-T-Lymphozyten vermittelt zu sein, obgleich bei alleiniger Disparität von Klasse I-MHC-Antigenen CD8-Zellen als potenter Mediator der Abstoßung fungieren können<sup>24; 72; 120; 185</sup>. Außerdem sind, wie bereits erwähnt, auch B-Lymphozyten und Antikörper an der Immunantwort beteiligt. Die Interaktionen dieser verschiedenen Zellpopulationen sowie deren Freisetzung autokrin und parakrin wirkender Zytokine mit konsekutiver Sekretion zellspezifisch interagierender Chemokine führen zu einem äußerst komplexen Abstoßungsgeschehen.

### 1.4.2.1 Lymphozyten, mononukleäre Phagozyten und Entzündungszellen

Die Spezifität der immunologischen Reaktionen kommt durch die Lymphozyten zustande, die als alleinige Zellen des Körpers alloantigene Strukturen spezifisch erkennen können. Trotz ihrer morphologischen Ähnlichkeit lassen sich funktionell im Wesentlichen drei Klassen unterteilen. Neben den NK-Zellen sind dies die T- und B-Lymphozyten. Sie stammen ursprünglich von derselben pluripotenten Stammzelle ab wie alle anderen kernhaltigen Blutzellen. Im Knochenmark findet die Differenzierung dieser Stammzellen in alle hämatopoetischen Zelllinien statt. Dies trifft auch für die B-Lymphozyten zu, deren frühe Reifungsschritte im Knochenmark ablaufen und die als einzige Antikörper bilden können. Eine Ausnahme bilden die T-Lymphozyten, denn im Rahmen der T-Lymphopoese ist es wichtig, dass Progenitorzellen der T-Zelllinie das Knochenmark in einem frühen Entwicklungsschritt verlassen und auf dem Blutweg in die äußeren Schichten des Thymus eintreten. Während der Wanderung vom Kortex in das Mark des Thymus erfährt der T-Lymphozyt im Wesentlichen zwei Selektionsschritte. Zum einen findet die so genannte positive Selektion statt, d.h. es werden alle T-Lymphozyten eliminiert, die nicht mit dem MHC reagieren können (MHC-Restriktion), zum anderen werden in einem negativen Selektionsvorgang alle potentiell autoreagierenden Zellklone inaktiviert, um schließlich ein eigen-tolerantes, MHC-restringiertes T-Zell-Repertoire zu erhalten. Im Mark des Thymus erlangen die Thymozyten ihre Helfer- (CD4) oder zytotoxischen (CD8) Fähigkeiten. Nach abgeschlossener Reifung verlässt der „erwachsene“ naive T-Lymphozyt schließlich den Thymus und wandert in die sekundär lymphatischen Gewebe, wo er durch Erkennung seines spezifischen Antigens aktiviert wird<sup>31; 108; 194</sup>.

Man kann die T-Lymphozyten ihrerseits in funktionelle Subpopulationen unterteilen. Für das Verständnis aller T-Zellen ist es jedoch wichtig, dass sie nicht auf lösliche antigene Strukturen, sondern nur auf an die Zelloberfläche akzessorischer Zellen gebundene Antigene reagieren können. Dabei erkennen CD4-T-Zellen (sog. Helferzellen) ihre spezifischen Antigene nur, wenn sie gleichzeitig mit dem Klasse II-MHC-Komplex dargeboten werden. Eine weitere Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen resultiert schließlich in einer vornehmlich zellvermittelten (Th1) oder eher humoralen (Th2) Immunantwort. Die zweite Subpopulation repräsentieren die CD8-T-Zellen (auch als „zytotoxische Killerzellen“ bezeichnet), die nach Stimulation gegen Zellen gerichtet sind, auf deren Zelloberfläche die spezifisch antigenen Determinanten an Klasse I-MHC-Moleküle anhaften<sup>122; 150</sup>.

Die Abstoßung des fremden Gewebes wird vor allem initiiert durch CD4-T-Zellen, die – wie unter 1.4.2.3 genauer beschrieben – den fremden MHC über TCR-vermittelte Prozesse erkennen. Dabei sind diese antigenen Strukturen entweder als intakte Moleküle auf der Oberfläche von Spender-Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert (so genannte direkte Erkennung)<sup>25; 85</sup> oder werden den T-Zellen alternativ als Peptidfragmente von körpereigenen APZ dargeboten (indirekte Erkennung)<sup>68; 173</sup>. Es gibt experimentelle Hinweise darauf, dass die direkte Erkennung eher im Rahmen der akuten Abstoßung von Bedeutung ist<sup>26; 112</sup>, wohingegen bei der chronischen Abstoßung mehr die indirekte Erkennung antigenen Moleküle eine Rolle zu spielen scheint<sup>25; 44; 174; 197</sup>. Obwohl zahlreiche Untersuchungen darauf hindeuten, dass die Expression verschiedener Zytokine des Th1-Subtyps im Rahmen akuter Abstoßungsreaktionen und die des Th2-Subtyps bei chronisch abgestoßenen Transplantaten auftritt<sup>38; 77; 138; 168; 172; 186</sup>, gibt es hierzu Analysen mit genau entgegengesetzten Ergebnissen<sup>36; 109; 152</sup>.

Sowohl in der akuten als auch in der frühen Phase der chronischen Abstoßung lassen sich im zellulären Infiltrat zahlreiche T-Zellen erkennen. Daneben finden sich beim chronischen Transplantatversagen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls Monozyten bzw. Makrophagen im Infiltrat. Sie scheinen somit an der Generierung der Intimaproliferation und letztlich am Entstehen der chronischen Abstoßung entscheidend Einfluss zu nehmen<sup>2; 84; 164</sup>. Im Rahmen immunhistochemischer Analysen lassen sich in den transplantierten Organen IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nachweisen, auch findet man erhöhte Spiegel von MCP-1; dieses Chemokin könnte an der Rekrutierung mononukleärer Zellen in die sich vergrößernde Intima beteiligt sein<sup>2; 164</sup>. Ebenfalls erhöht ist die Expression von MHC-II und ICAM-1<sup>79</sup>. In

einer späteren Phase der chronischen Rejektion ist die Organinfiltration bestimmt durch Makrophagen, weniger lassen sich T-Zellen nachweisen. Diese Phase der chronischen Abstoßung ist vor allem charakterisiert durch die Proliferation glatter Muskelzellen und die Expansion der Intima mit vereinzelt auftretenden Infarktgebieten <sup>6</sup>. Im Endzustand schließlich besteht eine massive Proliferation glatter Muskelzellen, eine stark ausgeprägte Intimaproliferation, ausgeweitete Infarktgebiete und eine persistierende Infiltration von Makrophagen bei starkem Rückgang der T-Zellinfiltration. Es lassen sich erhöhte Spiegel verschiedener Th2-spezifischer Zytokine nachweisen, wie etwa IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , PDGF und epidermaler Wachstumsfaktor, die womöglich entscheidenden Einfluss auf die Proliferation der glatten Muskelzellen nehmen <sup>73; 79</sup>.

### 1.4.2.2 T-Lymphozyten und Antigenpräsentation

Die entscheidenden Zielstrukturen der Transplantatabstoßung sind die Transplantationsantigene des „Major Histocompatibility Complex“ (MHC), die durch eine Vielzahl hochpolymorpher Gene kodiert werden <sup>89; 90; 184</sup>. Die entsprechenden Antigene, die beim Menschen maßgeblich für die Gewebeabstoßung verantwortlich sind, werden als „Human Leucocyte Antigene“ (HLA) bezeichnet <sup>51</sup>. Die verschiedenen MHC-Gene werden in zwei Gruppen eingeteilt, Klasse I-Moleküle (HLA-A, -B, und -C) und Klasse II-Moleküle (HLA-DR, -DQ und -DP) <sup>89; 90; 184</sup>. Die HLA Klasse I-Antigene werden auf nahezu allen kernhaltigen Zelltypen in Form polymorpher Membranglykoproteine exprimiert. Die Membranproteine der Klasse II sind demgegenüber nur auf immunkompetenten Zellen wie den B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen (DZ) anzutreffen <sup>47; 48; 80</sup>. In-vitro-Studien zeigen, dass Klasse I- und Klasse II-Moleküle einer Regulation durch verschiedene Mediatoren, darunter Zytokine wie etwa IFN- $\gamma$ , unterliegen. Im Rahmen verschiedener Immunreaktionen, wie etwa der Transplantatabstoßung, werden diese MHC-Strukturen hochreguliert. Dieser Mechanismus kann zu einer verstärkten und potenten Reaktion gegen das Fremdgewebe beitragen, ist jedoch allein genommen nicht pathognomonisch für die Abstoßungsreaktion, da eine verstärkte Expression dieser MHC-Molekül-Komplexe auch in toleranten Empfängern und bei anderen Immunreaktionen zu beobachten ist <sup>12; 14; 59; 131; 153</sup>.

Klasse I- und Klasse II-Moleküle sind aus konstanten und variablen Regionen aufgebaut. In beiden Fällen sind die konstanten Anteile dabei so angeordnet, dass sie extrazellulär gelegene Gruben bilden, in denen die variablen Bereiche der MHC-Moleküle anzutreffen sind. In diesen Vertiefungen werden unterschiedlich lange Peptide gebunden.<sup>20; 21; 30; 102</sup>. Abhängig von der Präsentation dieser antigenen Determinanten in Kombination mit entweder MHC-I- oder MHC-II-Proteinen kommt es zur Interaktion mit den unterschiedlichen T-Lymphozyten-Subpopulationen. CD4-T-Lymphozyten erkennen Antigene in Kombination mit dem MHC-II-Komplex. Diese Antigene sind vorher von APZ aufgenommen worden, wo sie einer intrazellulären Prozessierung unterzogen wurden und jetzt als unterschiedlich lange Peptidfragmente auf deren Zelloberfläche dargeboten werden<sup>206</sup>. Klasse I-MHC-Komplexe sind Angriffspunkt von CD8-T-Lymphozyten. Die MHC-I-Moleküle präsentieren hierbei endogen synthetisierte Antigene, wie virale oder allogene Peptide<sup>5; 7; 11</sup>. Sowohl bei den Klasse I- als auch den Klasse II-Molekülen ist das präsentierende AG in der Peptidbindungsregion des MHC-Komplexes in Verbindung mit den MHC-Molekülen verantwortlich für die Spezifität der T-Zell-Antigenerkennung.

### 1.4.2.3 Antigenerkennung, T-Zellaktivierung, Kostimulation und Chemokine

Die spezifische MHC-restringierte AG-Erkennung durch T-Lymphozyten erfolgt über den T-Zell-Rezeptor. Der Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus einer 43-kDa- $\alpha$ - und einer 43-kDa- $\beta$ -Kette. Sie sind über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden und mit variablen und konstanten Regionen ausgestattet. An die extrazelluläre Domäne schließen sich die vornehmlich aus hydrophoben AS bestehende transmembranale und schließlich die zytoplasmatische carboxyterminale Domäne der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette an. Die variablen Regionen des TCR sind für dessen Spezifität verantwortlich; sie binden die prozessierten Peptidantigene, die auf der Oberfläche von APZ an die MHC-Moleküle gebunden sind, sowie polymorphe Strukturen des MHC-Komplexes selbst<sup>130</sup>. Aus dieser AG-MHC-Bindung der T-Zellen resultiert die in mehreren Schritten ablaufende T-Zellaktivierung. Es erfolgt eine Signaltransduktion ins Innere der Zelle, die über die mit dem TCR assoziierten CD3-Proteine vermittelt wird. Die Verbindung der CD3-Proteine und einer entweder als Homo- oder Heterodimer angeordneten weiteren Kette bilden zusammen mit dem TCR- $\alpha\beta$ -Heterodimer den sog. TCR-Komplex<sup>46; 161</sup>. Neben dem für die spe-

zifische AG-Erkennung verantwortlichen TCR-Komplex werden noch einige andere Membranproteine auf der Oberfläche der T-Zelle exprimiert, die als akzessorische Moleküle bei Bindung an ihre entsprechenden Liganden die Interaktion des AG-MHC-Komplexes mit der variablen Region des TCR verstärken. Dadurch wird der T-Zelle die Möglichkeit gegeben, mit der APZ lange genug in Verbindung zu bleiben, um neben der spezifischen MHC-Peptid-Bindung weitere kostimulatorische Signale zu erfahren, die für die T-Zellaktivierung und anschließenden Effektorfunktionen von entscheidender Bedeutung sind. Korrelat einer erfolgten T-Zellaktivierung ist unter anderem die Synthese von IL-2, das die T-Zelle zur Proliferation und Differenzierung in die Effektorzelle anregt<sup>35; 52; 132</sup>.

Wichtige Rezeptor-Ligandenpaare zwischen T-Lymphozyten und entsprechender Zielzelle sind die zur Integrinfamilie gehörenden Moleküle LFA-1 (CD11a, CD18a) mit den Liganden ICAM-1 (CD54) und ICAM-2, LFA-2 (CD2) mit seinem Ligand LFA-3 (CD58), sowie die VLA-Moleküle 4, 5 und 6 mit ihren Liganden VCAM-1 und Liganden der extrazellulären Matrix<sup>180; 183</sup>. Neben ihrer Bedeutung als wichtige Kostimulationssignale für die T-Zellaktivierung dienen sie hauptsächlich als Adhäsionsmoleküle. So werden ICAM-1 wie auch VCAM-1 neben einer Reihe anderer Zelltypen auch auf aktivierten Endothelzellen exprimiert. Das heißt, dass die Interaktion VLA-4 – VCAM-1 bzw. LFA-1 – ICAM-1 entscheidend an der Wanderung und Rekrutierung der Lymphozyten aus dem Blut an Orte entzündlicher Geschehen beteiligt ist<sup>158; 181</sup>. In diesen Prozess sind unter anderem chemotaktisch wirkende Zytokine verwickelt, die als potente Immunmediatoren auf die Extravasation der Lymphozyten vom Blut ins Gewebe einwirken<sup>32; 181</sup>. So kann man sich die Interaktion verschiedener Selektine, den bereits erwähnten Integrinen und den sog. Chemokinen – auf sie wird unter 1.4.2.4 genauer eingegangen – im Rahmen dieses transendothelialen Migrationsprozesses der Leukozyten modellhaft folgendermaßen vorstellen. Chemokine werden an Orten von Entzündungsreaktionen – wie etwa auch bei der Transplantation allogener Organe – und Infektionen durch verschiedene Zelltypen, u.a. rekrutierte Lymphozyten und zytokinaktivierte Endothelzellen, sezerniert (Abb.2). Stimuli können zum Beispiel LPS, proinflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF- $\alpha$  sein<sup>9</sup>, genauso wie das von Th1- oder Th2-Zellen sezernierte IFN- $\gamma$  und IL-4<sup>62; 63</sup>. Die Chemokine werden, bedingt durch ihre Fähigkeit, an Proteoglykane zu binden, intrazellulär sowie auf luminal gerichteten Zelloberflächenstrukturen zurückgehalten, woraus ein Konzentrationsgradient um das entsprechende Entzündungsgebiet resultiert. Naive Lymphozyten bewegen sich entlang der Endothelzellen (sog. „Rolling“) – vermittelt über verschiedene Selektine – und treten über



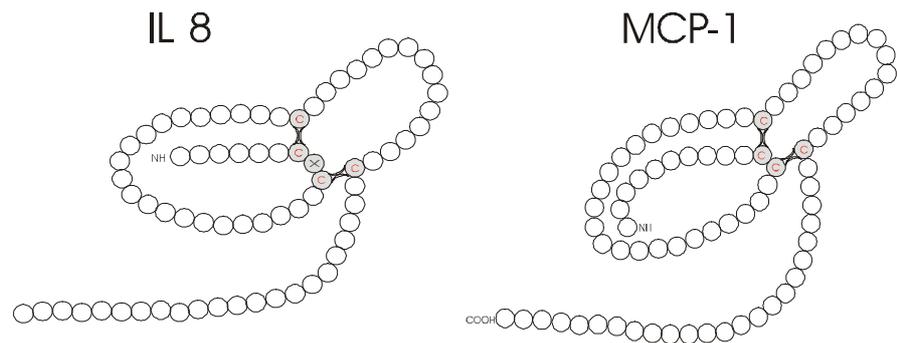
### 1.4.2.4 Interaktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren

Die Superfamilie der Chemokine wird aus einer ständig wachsenden Anzahl kleiner, ungefähr 8-10 kDa schwerer Polypeptide gebildet. Die Namensgebung resultiert aus ihrer Fähigkeit, im Rahmen immunologischer Vorgänge bestimmte Zellen an den Ort entzündlicher Reaktionen zu locken (Chemotaxis und Zytokine)<sup>10; 16</sup>. Zudem sollen sie an der Regulation der Lymphozytenwanderung zwischen Blut, Gewebe und lymphatischen Organen beteiligt sein<sup>33; 69; 182</sup>, was unter anderem auch für die Reifung und Differenzierung von potenten Immunzellen und die Generierung sekundärer lymphatischer Organe wichtig ist. Verschiedene Chemokine werden dabei konstitutiv exprimiert, vor allem im Thymus, Knochenmark und in sekundär lymphatischen Organen. Sie kontrollieren damit die Leukozytenwanderung unter physiologischen Bedingungen. Im Gegensatz dazu ist die Rekrutierung von Leukozyten in entzündliche Gewebe abhängig von der Induktion bestimmter Chemokine, die bedingt durch die Präsenz inflammatorischer Stimuli lokal sezerniert werden. Trotz der großen Anzahl an bislang entdeckten Chemokinen handelt es sich um eine strukturell relativ homogene Familie. Erstmals kam es 1955 zur Beschreibung eines Chemokins (PF4)<sup>157</sup>. Seit dieser Zeit, v.a. aber während der letzten zehn Jahre, wurden zahlreiche weitere Chemokine entdeckt, so dass heute mehr als 40 bekannt sind. Es wurde eine weitere Unterteilung in vier Subfamilien durchgeführt, wovon zwei besonders intensiv untersucht und charakterisiert wurden. Es handelt sich um die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Familie. Die Vertreter dieser Gruppen enthalten jeweils vier konservierte Cystein-AS, und ihre Zuordnung zur jeweiligen Subfamilie basiert auf der Position der ersten beiden Cysteine. In der  $\alpha$ -Familie sind diese direkt aneinandergesetzt (CC-Gruppe), Vertreter der  $\beta$ -Familie weisen zwischen den beiden Cysteinresten eine andere AS auf (CXC-Gruppe, *Abb.3*)<sup>101</sup>. CXC-Chemokine wirken vornehmlich auf neutrophile Granulozyten, wohingegen sich CC-Chemokine chemotaktisch auf T-Zellen und Monozyten auswirken<sup>10</sup>. Die erste und dritte sowie die zweite und vierte Cystein-AS verbindet jeweils eine Disulfidbrücke. In beiden Subfamilien weisen die Chemokine eine kurze, aminoternale Domäne auf, die der ersten Cystein-AS vorausgeht; es folgt der Hauptkomplex des Proteins, bestehend aus  $\beta$ -Strängen und zwei Schleifen zwischen der zweiten und vierten Cystein-AS. Daran schließt sich eine carboxyterminale  $\alpha$ -Helix-Struktur aus 20-30 AS an<sup>8</sup>.

Darüber hinaus sind zwei weitere Chemokine entdeckt worden, deren struktureller Aufbau keine Zuordnung zu der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Familie zulässt. Bei Lymphotaktin handelt es sich um

ein Polypeptid, das lediglich zwei Cysteinreste enthält, folglich nur zur Ausbildung einer Disulfidbrücke befähigt ist <sup>106</sup>. Es ist derzeit einziger Vertreter der so genannten C-Gruppe. Ebenso existiert bislang erst ein Protein in der CX<sub>3</sub>C-Gruppe – Fraktalkine, ein membran-gebundenes Glykoprotein mit der Struktur CXXXC <sup>15</sup>. Beide Subfamilien repräsentieren womöglich zwei weitere Untergruppen mit weiteren, derzeit noch unbekanntem Chemokinen.

**Abb.3:** Darstellung von MCP-1 als Vertreter der CC-Chemokine und IL8 als Vertreter der CXC-Chemokine; nach Prieschl et al.



Ihre spezifische Wirkung entfalten Chemokine über die Aktivierung verschiedener Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Es zeigt sich, dass nicht alle Rezeptoren und Chemokine ausschließlich selektiv wirken. Chemokinrezeptoren können durchaus mit mehreren Chemokinen interagieren, genauso scheinen verschiedene Chemokine in der Lage zu sein, Bindungen mit mehreren Rezeptoren eingehen zu können. Die bisher erforschten Chemokinrezeptoren scheinen alle aus 7 $\alpha$ -Helices aufgebaut zu sein, die transmembranal in den Zellwänden verankert sind. Dabei handelt es sich um 300 bis 400 AS lange Polypeptidketten mit einem extrazellulären, NH<sub>2</sub>-terminalen Ende. Sie sind gekoppelt an ein GTP-bindendes Protein, das funktionell mit einer Phospholipase C verbunden ist <sup>23;53</sup>. Über die Rezeptoraktivierung kommt es letztlich zu einer Reihe von Vorgängen, unter anderem der Generierung sekundärer Botenstoffe mit konsekutiver Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Depots. Darüber hinaus werden kleine GTP-bindende Proteine der Ras- und Rho-Familie aktiviert <sup>111</sup>, von denen die Rho-Proteine durch Regulation aktinabhängiger Prozesse – wie z.B. der Bildung von Pseudopodien oder der Induktion bestimmter Adhäsionskomplexe auf der Zelloberfläche – in den Vorgang der Zellbewegung mit einbezogen sind. Die Bildung von O<sub>2</sub>-Radikalen sowie die Entleerung zytoplasmatischer Granula (mit Proteasen bei Neutrophilen, Histamin bei Basophilen und zytotoxischen Proteinen bei Eosinophilen)

scheinen ebenfalls über die Aktivierung bestimmter Chemokinrezeptoren zustande zu kommen<sup>10</sup>.

Verschiedene Studien lassen vermuten, dass Chemokine letztlich über zwei Abschnitte mit ihrem jeweiligen Rezeptor in Verbindung treten<sup>176; 199</sup>. Initial kommt es zur Interaktion des Hauptbereichs des Proteins mit der Oberfläche des Rezeptors. Dies bewirkt eine Konformationsänderung des gebildeten Komplexes, wonach eine zweite Bindungsstelle im Bereich des aminoterminalen Endes des Chemokins durch den Rezeptor besetzt wird. Gerade diese zweite Interaktion von Chemokin und Rezeptor scheint für die Entwicklung der chemotaktischen Fähigkeit der Zelle verantwortlich zu sein.

### 1.4.2.5 Der CCR4-Rezeptor und seine Liganden

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Auswirkungen eines CCR4-Defekts auf den akuten und chronischen Transplantatverlust untersucht werden. Es ist daher die Frage zu stellen, auf welchen Zellen dieser Rezeptor exprimiert wird und welche Liganden an ihn binden. Die Expression des für Vertreter der CC-Familie spezifischen Rezeptors wird derzeit kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien sprechen von einer selektiven Expression auf Th2-T-Zellen<sup>22; 165</sup>, in anderen Untersuchungen wurden CCR4-mRNS-Spiegel auch in anderen Zelltypen gefunden, darunter Blutplättchen<sup>155</sup>, Monozyten<sup>156; 159</sup> und basophilen Granulozyten<sup>156</sup>. Neuere Ergebnisse bestätigen die Expression von CCR4 auch auf NK<sup>99</sup> und NKT Zellen<sup>107; 113</sup>. Genauso umstritten war längere Zeit die Bestimmung der entsprechenden CCR4-Liganden. So wurden anfangs die Chemokine MIP-1 $\alpha$ , RANTES und MCP-1 als potentielle Liganden für den CCR4-Rezeptor angesehen<sup>156</sup>. Mittlerweile ist diese These durch zahlreiche Studien widerlegt. Derzeit existieren gesicherte Daten für die Bindung zweier Liganden an CCR4.

Zum einen handelt es sich um das Chemokin „Thymus and Activation-regulated Chemokine“ (TARC oder CCL17), dessen Namensgebung aus der konstitutiv hohen Expression im Thymus resultiert<sup>203</sup>. Darüber hinaus findet eine Expression in sekundär lymphatischen Organen wie Lymphknoten oder Appendix statt, nicht jedoch in der Milz<sup>4</sup>. Obwohl bereits einige Chemokine mit Einwirkung auf T-Zellen bekannt sind, scheint TARC das erste Chemokin mit hoher Spezifität für Th2-T-Zellen zu sein<sup>96; 203</sup>.

Ein zweiter hochaffiner funktioneller Ligand für CCR4 ist das Chemokin „Macrophage derived Chemokine“ (MDC oder CCL22). Es lassen sich einige Gemeinsamkeiten zu TARC herstellen. Bei 37% Homologie bezüglich der AS-Struktur<sup>97</sup> sind beide Chemokin-Gene auf Chromosom 16 lokalisiert<sup>66; 137</sup>, im Gegensatz zu verschiedenen anderen Chemokinen, deren Genlokus auf Chromosom 17 zu finden ist<sup>9</sup>. Die Synthese von MDC findet hauptsächlich in Makrophagen und dendritischen Zellen statt<sup>66</sup>; zudem wird es konstitutiv von B-Zellen, bei Stimulierung auch von NK-Zellen, Monozyten und CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten synthetisiert<sup>4</sup>. TARC wird vor allem von zytokinstimulierten Monozyten bzw. Makrophagen<sup>98</sup>, dendritischen Zellen<sup>116</sup> und zu einem gewissen Anteil auch von aktivierten B-Zellen<sup>169</sup> gebildet. Interessanterweise lässt sich in vitro die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation, induziert durch TARC, durch vorherige Applikation von MDC blocken, umgekehrt tritt dieser Effekt nicht in Erscheinung. Dies zeigt möglicherweise, dass MDC neben CCR4 auch noch an andere – bislang unbekannte – Rezeptoren binden kann<sup>4</sup>. Dennoch ist MDC hoch spezifisch für Th2-Zellen<sup>22; 165</sup>, im Vergleich zu TARC sogar mit dreifach höherer Affinität<sup>97</sup>, wobei sich seine chemotaktische Wirkung auch auf DZ und NK-Zellen<sup>66; 97</sup> sowie auf basophile Granulozyten erstreckt<sup>165</sup>.

### 1.5 Das Galliumnitratmodell der chronischen Abstoßung

Das lange Jahre gängige und in der Klinik als Basisimmunsuppressivum verwendete Medikament ist das Cyclosporin A. Durch intensive Erforschung immunsuppressiver Medikamente kann der klinische Transplantationsmediziner heute auf eine ganze Reihe von etablierten Strategien zur Konservierung der Organfunktion zurückgreifen<sup>37; 50; 144; 146</sup>. Ein immunsuppressiver Wirkstoff, der im Rahmen der humanen Transplantatmedizin keinen Einsatz gefunden hat, ist Galliumnitrat. In der Klinik wurde GN versuchsweise eingesetzt, um Hyperkalzämien bei bestimmten Krebsleiden zu behandeln, weiterhin fand es Verwendung in der Therapie des Morbus Paget<sup>127</sup>. In Studien zeigte sich, dass GN die humanen allo-genen T-Zell-Antworten in vitro hemmt<sup>94</sup>, andere Untersuchungen wiesen Zusammenhänge zwischen der Applikation von GN und der Unterdrückung bestimmter autoimmuno-logischer Erkrankungen auf, wie etwa Enzephalomyelitiden in Ratten<sup>200</sup>.

Die immunsuppressive Wirksamkeit von GN ist in einem direkten Vergleich mit dem monoklonalen Antikörper anti-CD4 ( $\alpha$ CD4) GK1.5 an heterotop transplantierten Mausherzen

gezeigt worden. Bei der Applikation von GN in einem festgelegten Therapieschema über einen Zeitraum von 30 Tagen kam es in 78% der Fälle zu einem Transplantatüberleben über den 60. Tag hinaus. Die Überlebenskinetik der mit  $\alpha$ CD4 mAK behandelten Versuchstiere erwies sich diesbezüglich in nur 58% der Transplantate als erfolgreich<sup>139</sup>.

Der genaue Wirkungsmechanismus ist bislang unbefriedigend geklärt. Bei Gallium handelt es sich um ein Gruppe-IIIa-Metall mit gewissen Ähnlichkeiten zu Eisen. Diese liegen darin, dass es ebenso an das Eisen-Transportprotein Transferrin bindet<sup>81; 110</sup> und intrazellulär in Ferritin überführt werden kann<sup>42; 86</sup>. Die zelluläre Aufnahme von Gallium wird durch dessen Bindung an Transferrin gesteigert<sup>110</sup>. Der entstandene Gallium-Transferrin-Komplex blockiert die zelluläre Aufnahme von Eisen, was zur Abnahme der intrazellulären Eisenkonzentration und damit zur Inhibition zellulärer Proliferation führt<sup>41</sup>. Möglicherweise ist diese antiproliferative Wirkung Resultat einer Beeinflussung der Aktivität der Ribonukleotidreduktase. Denn einerseits kann durch Gallium der Einbau von Eisen in eine eisentragende Untereinheit des Enzyms verhindert werden<sup>40; 136</sup>, andererseits wird die Aktivität dieses Enzyms durch die intrazelluläre Abnahme an Eisen gesenkt<sup>39</sup>.

Trotz der zum Teil persistierenden starken Herzkontraktionen und der makroskopischen Ähnlichkeiten mit syngenen Transplantaten konnten bei Behandlung mit GN in histopathologischen Analysen allogener Transplantate deutliche Zeichen entzündlicher Prozesse und Gewebeveränderungen festgestellt werden, wie etwa Hyperplasien der Intima von Gefäßen, vaskuläre und perivaskuläre Infiltrationen oder Endothelveränderungen. Diese Befunde sind mit den histopathologischen Kriterien für ein spätes Transplantatversagen im Rahmen humaner Transplantationen durchaus vergleichbar. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, GN als potentes Immunsuppressivum gegen akute Episoden der Abstoßung einzusetzen, um schließlich die pathologischen Phänomene des späten Transplantatversagens untersuchen zu können.

## 1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die chronische Transplantatabstoßung ist ein sehr ernstzunehmendes klinisches Problem, das in über 50% aller Langzeitresultate bei Nieren-<sup>13</sup> und Herzallotransplantaten<sup>144; 167</sup> in Erscheinung tritt. Es ist derzeit Gegenstand intensiver klinischer Forschung, den Einfluss

der Chemokine auf diesen Prozess näher beschreiben zu können. *Mulligan et al.*<sup>135</sup> zeigten, dass durch die Gabe eines RANTES neutralisierenden Antikörpers ein verlängertes Überleben heterotop transplantiertter Rattenherzen erreicht werden konnte. Ebenso wiesen CCR1 defiziente Mäuse eine signifikante Verlängerung des Überlebens ihrer allogenen Transplantate auf<sup>61</sup>. *Horuk et al.*<sup>91</sup> ist es gelungen, unter der Gabe eines funktionellen Antagonisten für CCR1 eine Verlängerung des Transplantatüberlebens im Rattenmodell zu erreichen. *Robinson et al.*<sup>162</sup> zeigten, dass durch die Blockade von CX<sub>3</sub>CR1 mit polyklonalen Antikörpern ein deutlicher Überlebensvorteil der im Vergleich zum Empfänger in allen MHC-Allelen unterschiedlichen Herzen auftrat. Schließlich konnte in neuen Studien durch die Applikation subtherapeutischer Dosen von Cyclosporin A ein indefinitives Transplantatüberleben in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen ohne Zeichen chronischer Abstoßungsprozesse nachgewiesen werden<sup>78</sup>. Die Rolle des CCR4-Rezeptors ist im Rahmen der akuten sowie chronischen Abstoßung dagegen bisher nur unzureichend untersucht worden.

Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass Th1- und Th2-T-Lymphozyten eine unterschiedliche Chemokinrezeptorexpression aufweisen. So lassen sich Th1-Zellen typischerweise über die Expressierung der Rezeptoren CXCR3 und CCR5 nachweisen, für den Th2-Subtyp ist der CCR3-, CCR4- sowie CCR8-Rezeptor charakteristisch<sup>22; 119; 165; 166; 208</sup>. Trotz dieser Entdeckungen und der daraus resultierenden Vorstellung, dass verschiedene Zelltypen auf Grund ihrer eigenen Rezeptorexpression ein unterschiedliches Migrationsverhalten gegenüber ihren entsprechenden Liganden zeigen, scheint der komplexe Mechanismus dieser Signale weitgehend ungeklärt. Für die Th2-Zellen wird angenommen, dass sie im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse eine entscheidende Rolle einnehmen<sup>1; 67; 118; 202</sup>. Darüber hinaus ließ sich für CCR4 eine vornehmliche Expression auf Th2-Zellen nachweisen<sup>4; 22; 98; 165</sup>, die durch eine TCR-vermittelte Aktivierung der Th2-Zellen heraufreguliert werden kann<sup>49</sup>. Neue Studien zeigten jedoch, dass neben chronisch aktivierten Th2-Zellen auch andere Zellen wie Blutplättchen, Monozyten und Makrophagen<sup>43</sup> bzw. NK-<sup>99</sup> und NKT-Zellen<sup>107</sup> zur Expression des CCR4-Rezeptors fähig sind. Möglicherweise spielt der CCR4-Rezeptor daher eine Rolle in der Rekrutierung aktivierter Makrophagen, T-Zellen oder NK- bzw. NKT-Zellen in Gebiete mit chronisch entzündlichen Reaktionen. Es wurde gezeigt, dass Chemokine entscheidend in den Prozess der transendothelialen Migration der Leukozyten eingreifen können<sup>121</sup>. Für TARC – einen spezifischen Liganden des CCR4-Rezeptors – konnte die Expression in aktiviertem Endothel (v.a. im Bereich der Haut) nachgewiesen werden<sup>34</sup>. Dadurch könnte TARC an der Positionierung von Lym-

phozyten in derartige Entzündungsgebiete beteiligt sein, wobei es deren Interaktion mit Endothelzellen vermittelt. MDC konnte ebenfalls als Ligand für CCR4 positive Zellen nachgewiesen werden. Es wird vor allem in DZ und Makrophagen exprimiert<sup>4;66</sup>. Von Makrophagen weiß man, dass sie eine wichtige Rolle im Rahmen sowohl akuter als auch chronisch-immunologischer Antworten spielen. Die Sezernierung immunologischer Mediatoren wie etwa MDC hätte dementsprechend ebenfalls eine selektive Rekrutierung CCR4-positiver Zellen in entzündliche Gebiete zur Folge.

Mit dem Modell der heterotopen Herztransplantation in der Maus, die in Kinetik und Dynamik der Abstoßung dem Menschen sehr nahe kommt, soll das Abstoßungsverhalten bei vorhandenem CCR4-Defekt untersucht werden. Es soll geprüft werden, inwieweit der CCR4-Rezeptor bzw. seine Liganden TARC und MDC am immunologischen Geschehen akuter sowie chronisch abgestoßener Transplantate beteiligt sind. Eine spezifische Methode der Charakterisierung der Rolle des CCR4-Rezeptors ist die Untersuchung an der CCR4<sup>-/-</sup> Maus, da dieser Mausstamm bis auf das Fehlen des Rezeptors keinerlei immunologischen Defekt aufweist. Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Reicht das alleinige Fehlen des Oberflächenmoleküls CCR4 aus, um ein verlängertes Überleben vollallogener, vaskularisierter Transplantate zu erzielen?
- 2) Findet eine Expression von MDC und TARC - neben aktiviertem Endothel im Bereich der Haut (s.o.) - auch in Herztransplantaten statt?
- 3) Gibt es Unterschiede bezüglich Qualität und Quantität der transplantatinfiltrierenden Zellen bei der CCR4<sup>-/-</sup> Maus gegenüber der Wildtyp-Maus im akuten Modell?
- 4) Lässt sich (dosisabhängig) durch die Gabe von Galliumnitrat ein chronisches Abstoßungsverhalten des Transplantats erzeugen?
- 5) Zeichnen sich bei der chronischen Abstoßung Unterschiede bei der CCR4<sup>-/-</sup> Maus gegenüber der Wildtyp-Maus (CCR4<sup>+/+</sup>) ab?
- 6) Gibt es Hinweise auf andere, zur chronischen Transplantatabstoßung beitragende Mechanismen?

## 2 Material und Methode

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Versuchstiere

---

Mausstamm	Bezugsquelle
C57BL/6 (H-2 <sup>b</sup> )	Charles River, Hannover Harlan Winkelmann, Borchten
BALB/c (H-2 <sup>d</sup> )	Charles River, Hannover Harlan Winkelmann, Borchten
CCR4 <sup>-/-</sup> (H-2 <sup>b</sup> )	Serono Pharmaceutical Research Institute, Genf, Schweiz

#### 2.1.2 Chemikalien

---

Chemikalie	Bezugsquelle
Acrylamid 40%	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA
AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol)	Sigma, Taufkirchen
Agarose	GibcoBRL, Eggenstein
Ammoniumacetat	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bis-Acrylamid 2%	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC (Diphenylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide	Boehringer, Mannheim

EDTA	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Galliumnitrat	Sigma Aldrich, Steinheim
Hämatoxylin-Eosin	Merck, Darmstadt
Harnstoff (Urea)	GibcoBRL, Eggenstein
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isomethylbutan	Sigma, Taufkirchen
Jung tissue freezing medium	Leica Instruments, Nußloch
Marker 1kb DNS Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Natrium-Citrat-Dihydrat Puffer	Sigma, Taufkirchen
Repel-Silane®	Pharmacia Biotech
TEMED (Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg

### 2.1.3 Radiochemikalien

---

Chemikalie	Bezugsquelle
$\alpha$ [33P]-Uridin 5'-Triphosphat	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA

### 2.1.4 Enzyme

---

Enzym	Bezugsquelle
cDNS Synthese Kit	GibcoBRL, Eggenstein
DNS-Taq-Polymerase	GibcoBRL, Eggenstein

### 2.1.5 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

---

Reagenz/Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden Falcon, New Jersey, USA Corning, New York, USA
RiboQuant™ MultiProbe RNase Protection Assay System	BD Pharmingen, San Diego, USA
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen

### 2.1.6 Geräte

---

Gerät	Hersteller
Elektrophorese	Agagel Maxi/Midi, Biometra, Göttingen
Geldokumentationssystem	Eagle EYE II, Stratagene, Heidelberg
Geltrockner	Gel Dryer Model 583, Biorad
Kryostat	Leitz KG, München
Kühlzentrifugen	JA-21 Beckmann, Palo Alto, USA Rotoren JA-14, JA-21
Phospho-Imager	Storm 840, Molecular Dynamics, USA
Photometer	LKB Biochrom Ultrospec Plus, Pharmacia, Uppsala, Schweden
Spannungsquellen	Power Pack P25, Biometra, Göttingen PS 9009 TC, GibcoBRL, Eggenstein
Sterilbank	HLB 2472, Heraeus, Hanau
Szintillations-Counter	Miaxi 4450, United Technologies Packard, Frankfurt
Zentrifugen	Megafuge 1,0, Heraeus, Hanau Omnifuge 2,0 RS, Heraeus, Hanau

### 2.1.7 Operationsinstrumentarium / -Material

---

Gerät	Hersteller
Operationsmikroskop (OPMI-6)	Firma Carl Zeiss, Oberkochen
mikrochirurgisches Besteck (Nadelhalter, Knüpfpinzette, Uhrmacherpinzetten, Vannasschere, Mikroschere, gebogene Pinzetten)	Plazotta, München
Operationsbesteck (Pinzette, Schere, Nadelhalter)	Plazotta, München
2 Biemerklappen (Biemer-Clip, Art.-Nr. 70562)	Aesculap-Werke AG, Tuttlingen
mikrochirurgischer bipolarer Gefäßkauter	Fischer-Medizintechnik, Freiburg
6/0 Seide (geflochtene Seide, nicht resorbierbar, Art.-Nr. EH 6760H)	Ethicon GmbH, Norderstedt
10/0 monofiler Faden (Ethicon schwarz monofil 10/0, doppelt armiert, BV-4, Best.-Nr. EH 7509)	Ethicon GmbH, Norderstedt
5/0 Ethicon Faden (Ethicon schwarz monofil 5/0, Best.-Nr. 1666H)	Ethicon GmbH, Norderstedt
kardioplege Lösung nach Brettschneider (HTK)	Köhler Chemie, Alsbach
folienüberzogene Korkplatte 20×30 cm	Baumarkt, München
Kompressen 10×10 cm, 7,5×7,5 cm	Lohmann&Rauscher GmbH, Rengsdorf
unsterile Wattestäbchen	Lohmann&Rauscher GmbH, Rengsdorf
handelsübliche Lösung zur Hautdesinfektion (Cutasept®)	Bode Chemie, Hamburg

## 2.2 Primer

Für die Untersuchung der Chemokin- bzw. Chemokinrezeptor-mRNS Expression wurden folgende Primer verwendet:

---

Primer	Sequenz
$\beta$ -Aktin sense	5'-ACA CCC GCC ACC AGT TCG-3'
$\beta$ -Aktin antisense	5'-ATG AGG TAG TCT GTC AGG TCC CG-3'
MDC sense	5'-GTT CTT CTG GAC CTC AAA ATC CTG-3'
MDC antisense	5'-TGG GGA GTA GGC ATT GGG TAA G-3'
TARC sense	5'-TGA GGT CAC TTC AGA TGC TGC TCC-3'
TARC antisense	5'-CCT GGA CAG TCA GAA ACA CGA TG-3'
CCR4 sense	5'-GCA TTG CTT CAT AGA CTG TCC TCA G-3'
CCR4 antisense	5'-TCC AAA AAC CCA ATG GTC GG-3'

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion GmbH, Martinsried, bezogen.

## 2.3 Stammlösungen und Puffer

---

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung	
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		pH 7,4
10 × PBS	137 mM	NaCl
	27 mM	KCl
	809 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	15 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		pH 7,4

Chloroform:Isoamylalkohol	98 % 2 %	Chloroform Isoamylalkohol
TAE Elektrophoresepuffer	40 mM 20 mM 2 mM	Tris, pH 8,0 Eisessig EDTA
6 × Gel Lade-Puffer	15 % 0,05 % 0,05 %	Ficoll Typ 400 Bromphenolblau Xylencyanol
dNTP-Mix	1 mM 1 mM 1 mM 1 mM	dATP dCTP dTTP dGTP
10 × PCR Puffer	500 mM 100 mM 15, 20, 25 mM 0,1 %	KCl Tris-HCl, PH 8,3 MgCl <sub>2</sub> Gelatine
10 × TBE Puffer	0,89 M 0,89 M 2 mM	Tris Borsäure EDTA pH 8,3

## 2.4 Heterotope Herztransplantation in der Maus

### 2.4.1 Tiermodell

Zur Bearbeitung der angegebenen Fragestellung wird ein vollallogenes Transplantationsmodell in der CCR4<sup>-/-</sup> Maus bzw. der Wildtypmaus ausgewählt. Die jeweiligen Spenderherzen werden heterotop durch Anastomosierung von Aorta und Pulmonalarterie an die großen infrarenalen Gefäße des Empfängers transplantiert. Hierbei ist die Empfängermaus durch Belassen ihres eigenen Herzens nicht auf das Funktionieren des Transplantates angewiesen und erlebt die Transplantatabstoßung ohne Beeinträchtigung des körperlichen Wohlbefindens. Ein weiterer Unterschied dieser Methode zur orthotopen Herztransplantation ergibt sich aus der Art der Gefäßanschlüsse. Der pars ascendens aortae des Spenderherzens wird mit der Aorta abdominalis, der Truncus pulmonalis mit der Vena cava abdominalis des Empfängers End zu Seit anastomosiert. Dies führt zu einem retrograden Blut-

fluss aus der Bauchaorta über den pars ascendens aortae und zu einem direkten Einstrom des Blutes in die Koronararterien unter Umgehung des linken Ventrikels. Von den Koronararterien ergießt sich das Koronarblut nach Passage der Koronarvenen und des Sinus venosus in den rechten Vorhof und findet schließlich über den rechten Ventrikel und den Truncus pulmonalis Anschluss an die Vena cava des Empfängers.

Zur Charakterisierung der Funktion des CCR4-Rezeptors *in vivo* werden CCR4<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet. Dieser durch homologe Rekombination gewonnene und bezüglich des CCR4-Rezeptors gendefiziente Mausstamm eignet sich in besonderem Maße, denn es kann der Defekt eines einzelnen Immunregulator-Gens in sonst unveränderten Tieren untersucht werden und damit dessen möglicher Einfluss auf den Ablauf einer akuten beziehungsweise chronischen Abstoßungsreaktion *in vivo* gezeigt werden. Die Blockierung dieses Rezeptors durch Antikörper würde eine weniger spezifische Aussage zulassen, da bei diesen eine Kreuzreaktivität mit anderen, womöglich unbekanntem Oberflächenstrukturen bestehen und es dementsprechend zu einer Beeinflussung der Ergebnisse kommen könnte. Damit die chronische Abstoßung am Herztransplantat untersucht werden kann, wird den Empfänger-mäusen als Immunsuppressivum Galliumnitrat subkutan verabreicht. In einer eigenen Untersuchungsgruppe wird mit unterschiedlichen Dosierungen therapiert, um schließlich ein geeignetes Therapieschema zur wirkungsvollen Unterdrückung der akuten Abstoßung zu entwickeln. Der funktionelle Unterschied der CCR4<sup>-/-</sup> Maus gegenüber der Wildtypmaus bzw. gegenüber der syngenen Kontrolle soll durch unterschiedliche Versuchsstrategien gezeigt werden:

- 1) Durch Erstellen einer Abstoßungskinetik zur Ermittlung eines, je nach Gruppe, verlängerten bzw. verkürzten Transplantatüberlebens. Als Abstoßungsparameter gilt hierbei der negative Palpationsbefund in der seitlichen Flanke der Maus.
- 2) Durch Entnahme und histomorphologische sowie immunhistochemische Untersuchung von Transplantaten zu bestimmten Zeitpunkten nach Transplantation – Tag 5, 30, 60 – soll ein eventueller Unterschied des Transplantatinfiltrates gezeigt werden.
- 3) Durch zusätzliche molekularbiologische Untersuchungen der entnommenen Organe wird versucht, mögliche unterschiedliche Expressionsmuster verschiedener Zytokine sowie Chemokine zu ermitteln und dadurch einen Wirkungsmechanismus der infiltrierenden Zellen zu ermitteln.

## 2.4.2 Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche sind gemäß Tierschutzgesetz von der Regierung von Oberbayern als zuständiger Behörde unter dem Aktenzeichen 211-2931-82/99 genehmigt worden.

## 2.4.3 Tierspezies und Tierhaltung

Alle Tierversuche werden an ingezüchteten weiblichen und männlichen Mäusen im Alter zwischen 8 und 12 Wochen durchgeführt. Ihr Gewicht beträgt jeweils 20-25 Gramm. Als Transplantatempfänger dienen  $CCR4^{-/-}$  Mäuse sowie in den Kontrollgruppen C57BL/6-Mäuse, beide mit dem Haplotyp H-2<sup>b</sup>. Als Spender werden BALB/c-Mäuse mit dem Haplotyp H-2<sup>d</sup> herangezogen – das heißt vollallogen zu den Empfängertieren in allen Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigenen.

Die nicht genveränderten Tiere (Wildtyp) werden von der Firma Harlan – Winkelmann GmbH, Borcheln, bezogen. Die gendefizienten Mäuse werden vom Serono Pharmaceutical Research Institute, Genf, bezogen und am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, gezüchtet. Die Tiere werden in Makrolonkäfigen (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) auf Einstreu bei Pressfutter (Altromin 1324 Standard-Diät, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum im Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität, gehalten.

## 2.4.4 Anästhesie

Die geeignete Anästhesieform für die heterotope Herztransplantation ist die Äthernarkose. Sowohl Spender- als auch Empfängermaus können in schmerzfreiem, bewusstseinslosem und relaxiertem Zustand operiert werden. Zudem lässt sich die Narkosetiefe – wie unten beschrieben – individuell verändern. Zur Narkoseeinleitung wird die Maus in ein Glasgefäß gesetzt, das am Boden mit äthergetränkten Kompressen ausgelegt ist. Nach etwa 10 bis 15 Sekunden verliert die Maus das Bewusstsein und entwickelt eine leichte Atemdepression. Aufrechterhalten wird die Narkose während der Operation durch ein –

ebenfalls in Äther getränkte Kompressen enthaltendes – Falconröhrchen (Fassungsvolumen 15 ml), worüber der Maus stetig Äther zur Inhalation zugeführt wird. Die Entfernung des Röhrchens vom Kopf der Maus bestimmt das Verhältnis von eingeatmetem Äther und freier Luft; somit ist eine Möglichkeit gegeben, die Narkosetiefe dem jeweiligen Operationsstadium anzupassen. Als Parameter zur Ermittlung der Narkosetiefe dienen die Bewegung der Schnurrbarthaare bzw. das respiratorische Verhalten der Maus.

### 2.4.5 Operationen

#### 2.4.5.1 Spenderoperation

Die zur Spenderoperation vorgesehene Maus wird – wie oben beschrieben – in Narkose versetzt. Anschließend wird die Maus auf dem Rücken liegend mittels Pflasterstreifen an ihren Extremitäten auf einem Korkbrett fixiert, auf dem sich bereits das Äther enthaltende Falconröhrchen befindet. Dadurch wird ein zwischenzeitliches Aufwachend der Maus verhindert.

Die Operation beginnt mit einer medianen Laparotomie, die Bauchhöhle wird mit zwei Kanülen offen gehalten, die das Peritoneum am Korkbrett fixieren. Der Darm wird in eine Komresse rechts neben die Maus verlagert, um anschließend mit Wattestäbchen stumpf die Vena cava inferior abdominalis und die Aorta präparieren zu können. Mit einer 1ml-Spritze wird die Aorta punktiert und die Maus entblutet. Der anfänglich bis zum Unterrand des linken Leberlappens durchgeführte Bauchschnitt wird bis zum Sternum erweitert. Es folgen zwei weitere Schnitte entlang des Rippenbogens, die das anschließende Ablösen des Diaphragmas von dessen Rippen- bzw. Sternalpartie ermöglichen. Nun folgt die Öffnung des Thorax über Schnitte entlang der mittleren Axillarlinie bis hin zur oberen Thoraxapertur; das Fixieren des Sternums über dem Kopf gewährleistet den freien Einblick in die eröffnete Brusthöhle. Über Punktion der Vena cava inferior kann das Herz mit kardiopleger Lösung durchspült und damit zum Stillstand gebracht werden. Nach stumpfer Präparation und Entnahme des Thymus werden insgesamt fünf Ligaturen mit 6/0 Seide vorgenommen. Nacheinander folgen Unterbinden des rechten und linken Lungenpakets jeweils am Hilus, Ligieren von Vena cava inferior und superior kurz vor deren Einfluss in den rechten Vorhof sowie der Vena hemiazygos ebenfalls vor deren Eintritt in den Vorhof.

Jetzt kann das Herz durch scharfe Präparation entlang des Ösophagus und nach Durchtrennung der ligierten Gefäße aus dem Spendertier entnommen werden.

Ex situ findet die Präparation von Truncus pulmonalis sowie Pars ascendens aortae statt. Diese werden mit einer gebogenen Pinzette unterfahren und herzfjern mit einer mikrochirurgischen Schere durchtrennt. Dadurch erhält man zwei homogene, relativ lange Gefäßstümpfe, die die Implantation in das Empfängertier erleichtern. Bis zu diesem Zeitpunkt wird das Herz bei 4°C in kardiopleger Lösung nach Brettschneider gelagert.

### 2.4.5.2 Empfängeroperation

Bei der Empfängermaus findet Narkoseeinleitung, Fixierung auf dem Korkbrett und mediane Laparotomie von Symphyse bis zum Unterrand des linken Leberlappens in gleicher Weise statt wie beim Spendertier. Nach Eröffnen der Bauchhöhle und Fixierung des Peritoneums wird der Darm in eine feuchte Kompresse rechts neben der Maus positioniert. Mit zwei Wattestäbchen wird unter leichten Drehbewegungen das Retroperitoneum eröffnet. Die jetzt zugänglichen Gefäße – Aorta abdominalis und Vena cava inferior – werden von paravasalem Fettgewebe und anliegenden Lymphknoten befreit. Die Präparation der Gefäße erfolgt von distal der Abgänge der Nierenarterien bis hin zur Aortenbifurkation. Etwasige Lumbalabgänge in diesem Abschnitt werden unterfahren und koaguliert, damit Arterie und Vene frei zu liegen kommen. Es werden zwei Biemerklammen so positioniert, dass das präparierte Areal zwischen Aortenbifurkation und Nierenarterien abgeklemmt ist. Zuerst wird mit der Vanasschere durch einen kleinen Längsschnitt die Aorta eröffnet. Nach Spülung des Lumens folgt eine End-zu-Seit-Anastomose des Pars ascendens aortae des Herzens an die Bauchaorta. Zwei Eckstiche fixieren die Gefäße, über jeweils fortlaufende Nähte mit einem 10/0 monofilen Faden erfolgt dann die Adaptation der Rück- und Vorderwände beider Gefäße. Bei der Anastomose von Truncus pulmonalis und Vena cava inferior verfährt man in gleicher Weise. Das Herz wird nach einer etwa 30 minütigen Ischämiezeit durch das Lösen der Klemmen reperfundiert. Die hellrote Verfärbung und Füllung der Koronargefäße sowie der zeitlich leicht versetzte Beginn der Herzkontraktion zeigen die erfolgreiche Durchführung der Operation an. Nachdem das Herz von anhängenden Fäden, Trachea- und Fettgewebsresten gesäubert und der Darm in die Bauchhöhle rückverlagert wurde, wird das Abdomen durch eine fortlaufende Naht der Muskulatur bzw. des

Peritoneums und eine anschließende Einzelknopfnah der Haut (jeweils 5/0 Faden) geschlossen.

Das Äther enthaltende Falconröhrchen wird vollständig vom Kopf des Tieres entfernt. Kurze Zeit später erwacht die Maus aus der Narkose. Die Dauer der Empfängeroperation beläuft sich in etwa auf 35 Minuten. Der Käfig wird weitere 20 Minuten unter eine Wärmelampe gestellt, der Maus werden postoperativ Tramaltropfen zur Schmerztherapie verabreicht.

### 2.4.5.3 Entnahme der Transplantate

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 5, 30, 60) nach Transplantation werden dem Tier sowohl Transplantat wie natives Herz zu histologischen, immunhistochemischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen entnommen. Narkoseeinleitung und Eröffnen der Bauchhöhle erfolgen wie bereits beschrieben. Nach makro- sowie mikroskopischer Untersuchung des Organs hinsichtlich Kontraktion bzw. Abstoßungsparameter (Induration, Verfärbung, Fleckung u.a.) kann das Herz aus dem Spenderorganismus entnommen werden. Das native Herz wird nach Thorakotomie (s.o.) scharf aus der Brusthöhle herauspräpariert. Die Maus wird über einen intrathorakalen Schnitt der Vena cava inferior entblutet. Beiden Herzen werden im Anschluss ex situ die Vorhöfe entfernt, die verbleibenden Kammern werden horizontal geteilt. Der größere, obere Herzabschnitt wird sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur späteren Verwendung im Rahmen des RNase Protektion Assay sowie der reverse Transkriptase PCR bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefroren. Der kleinere Teil wird in ein kleines Plastischälchen gegeben und mit Gefriermedium übergossen (Jung Tissue freezing medium), anschließend für etwa 10-15 Sekunden in Isomethylbutan gehalten, der sich wiederum in flüssigem Stickstoff befindet. Die so gefrorenen Herzblöcke werden bis zur histologischen Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.4.6 Medikamentöse Therapie

### 2.4.6.1 Allgemeine Medikation

Die Mäuse werden vom Tag der Operation an bis einschließlich zum fünften postoperativen Tag antibiotisch behandelt. Als geeignetes Medikament erweist sich Ciprobay® (Wirkstoff Ciprofloxacin), das in einer Konzentration von 3 mg/kg/die verabreicht wird. Darüber hinaus werden den Tieren zur Schmerzprophylaxe Tramaltropfen im Trinkwasser angeboten.

### 2.4.6.2 Immunsuppression

Um die akute Abstoßung des Transplantats zu verhindern, werden die Mäuse in einem festgelegten Therapieschema immunsuppressiv behandelt. Als Medikament kommt hierbei Galliumnitrat zur Anwendung. Hergestellt werden Konzentrationen von 30 mg/kg KG GN bzw. von 10 mg/kg KG GN in 100 µl Natrium-Citrat-Dihydrat-Puffer (5%). Verabreicht wird den Mäusen das Medikament in 100 µl-Injektionen subkutan in die Nackenpartie.

Zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungsbeziehung wird die Behandlung mit zunächst subtherapeutischen Dosen begonnen. Dabei wird den Mäusen unmittelbar postoperativ 30 mg/kg KG GN gespritzt, ebenso am dritten postoperativen Tag. Jeden weiteren dritten Tag bis zum einschließlich 30. postoperativen Tag werden Dosen von 10 mg/kg KG GN verabreicht. In den Experimentalgruppen werden permanent 30 mg/kg KG GN verabreicht. Die Medikation erfolgt hierbei am Operationstag, am ersten bis dritten postoperativen Tag und anschließend jeden weiteren zweiten Tag bis einschließlich 30. Tag. In vorausgegangenen Studien wurde bei intraperitonealen Injektionen von GN über einen Zeitraum von 10 Tagen bei täglicher Applikation von 63 mg/kg KG eine LD10 bzw. von 80 mg/kg KG eine LD50 ermittelt <sup>196</sup>.

## 2.4.7 Abstoßungsdiagnostik

Sowohl die Erfassung der akuten Abstoßung als auch die des späten Transplantatverlusts erfordert ein tägliches Prüfen der Herzaktion. Dabei soll der Grad der Abstoßung und damit die Funktion des Transplantats möglichst genau analysiert werden können, zum anderen aber soll dieser Vorgang möglichst unbelastend für das Versuchstier sein. Es ist daher ein Algorithmus der Untersuchungstechnik erarbeitet worden, der diese Gesichtspunkte berücksichtigt. Bei letztlich unklarem Befund wird zur nächst invasiveren Methode übergegangen.

### 2.4.7.1 Die Fingerpalpation

Die Fingerpalpation ist eine geeignete und zugleich das Versuchstier schonende Methode, um den Verlauf der Abstoßung täglich beurteilen zu können. Das Tier wird mit der linken Hand zwischen Daumen und Zeigefinger am Nackenfell sowie mit dem kleinen Finger am Schwanz fixiert, so dass ein komplikationsloses Überprüfen der Herzaktion in der Flanke der Maus mit der rechten Hand möglich ist. Hinsichtlich der Kontraktionskraft bzw. der Induration des Transplantats werden verschiedene Stadien der Abstoßung dokumentiert:

- Zustand +++      kräftige und regelmäßige Herzaktion, weicher Palpationsbefund;
- Zustand ++      deutliche, aber leicht schwächere Herzkontraktion, leichte Verhärtungen tastbar;
- Zustand +      tastbare, aber schwache Kontraktion, starke Verhärtungen tastbar.

Lässt sich keine eindeutige Aussage bezüglich der Herzaktion treffen, wird die Maus in Narkose versetzt, um das Transplantat in möglichst relaxiertem Zustand der Maus palpieren zu können. Bei eindeutig fehlender Herzaktion wird gleich die diagnostische Laparotomie vorgenommen.

### 2.4.7.2 Die diagnostische Laparotomie

Bei unklarem Palpationsbefund des narkotisierten Tieres schließt sich die diagnostische Laparotomie an, die eine genaue Aussage über die Herzaktion zulässt. Zur Dokumentation des zeitlichen Verlaufs der Abstoßung werden zwei weitere Phasen aufgeführt:

- Zustand 0+ keine tastbare, aber nach diagnostischer Laparotomie verifizierbare Herzaktion in Form von Fibrillationen;
- Zustand 0 fehlende Herzaktion

Ist das Herz makroskopisch sowie nach mikroskopischer Kontrolle abgestoßen, fehlt also definitionsgemäß jegliche Art von Herzaktion – erfolgt in Narkose die schmerzfreie Opferung des Tieres durch einen Herzschnitt. Die abgestoßenen Transplantate werden zur histologischen Aufarbeitung explantiert. Lässt sich jedoch noch eine geringe Herzkontraktion feststellen, so wird das Abdomen zugenäht und die Herzaktion bis zur finalen Abstoßung des Transplantats – in oben geschilderter Reihenfolge – weiterhin dokumentiert. Prinzipiell gilt, dass jede Abstoßung, sowohl akut wie chronisch, durch eine diagnostische Laparotomie bestätigt wird.

## 2.5 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen der Organe

### 2.5.1 Die Labormethoden zur Aufarbeitung der Organe

In narkotisiertem Zustand werden der Maus sowohl Transplantat wie auch Nativherz entnommen. Dabei werden die Herzen horizontal an den Vorhöfen entlang mit einer Schere scharf durchtrennt, so dass schließlich der Bereich der Herzkammern bis hin zur Herzspitze für die histologische Diagnostik gewonnen wird. Direkt nach der Explantation werden die Herzen mit ihrer Basis voran in Kunststoffschälchen gelegt und mit Einbettmedium übergossen (Jung, Tissue freezing medium®). Die Schälchen werden für etwa zehn Sekunden in Isomethylbutan getaucht, das wiederum über flüssigen Stickstoff gekühlt wird. Anschließend können die erhaltenen Gefrierblöcke bis zu deren Weiterverarbeitung bei - 80°C im Gefrierschrank gelagert werden.

Die Gefrierblöcke werden bei einer Kammertemperatur von  $-23^{\circ}\text{C}$  auf dem Schneidetisch des Kryostats fixiert, für die Schnitte wird eine Dicke von  $5\mu\text{m}$  gewählt. Diese werden auf Objektträger aufgebracht, kurz luftgetrocknet und dann acetofixiert. Bis zur histologischen Färbung können sie bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.5.2 Die konventionellen Färbungen

Ein Teil der Präparate wird zur Analyse der morphologischen Veränderungen im Transplantat dem klinischen Standard entsprechend mit Hämatoxylin-Eosin und Hämatoxylin-Pikrinsäure – nach van Gieson mit Darstellung kollagener Fasern – gefärbt. Die Färbungen wurden im Institut für allgemeine und spezielle Pathologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt.

### 2.5.3 Die immunhistochemischen Färbungen

Für die immunhistochemischen Färbungen werden ebenfalls sowohl Transplantat als auch – zur direkten Kontrolle – Nativherz des Empfängers verwendet. Zur Anwendung kommen hierbei monoklonale (Ratte-anti-Maus) Antikörper, die nach spezifischer Bindung und Durchführung entsprechender Auswasch- und Reinigungsschritte mit der Peroxidase-Antiperoxidasemethode gefärbt werden. Im Einzelnen werden folgende Strukturen angefärbt:

- Gr-1\*
- Mac-1\*\*
- CD4\*\*
- CD8\*\*
- B220\*

\*Ratte-anti-Maus mAK (Pharmingen, Hamburg)

\*\*Ratte-anti-Maus mAK (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA);

Die gebundenen Antikörper werden durch Inkubation mit einem peroxidasekonjugierten F(ab')<sub>2</sub>-Fragment (Maus-anti-Ratte IgG, Dianova, Hamburg) nachgewiesen. Um unspezifische Färbungen zu vermeiden, werden die Präparate mit Ziegenserum zur Absättigung

unspezifischer Ig-Bindungsstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Zerstörung endogener Peroxydase-reaktivität vorbehandelt.

Für die immunhistologische Färbung wird nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Organe ca. 5 µm dick schneiden
- Ca. 1 Stunde lufttrocknen
- 5 min. in PBS stellen
- 5% FKS 20 min (Blocken) [100% FKS in PBS verdünnen]
- 2× kurz in PBS waschen
- 5-10 min. in Aceton bei 4°C fixieren
- 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS 15 min. (Quenschen) [30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS verdünnen]
- 3× kurz in PBS waschen (je 1 min.)
- Primär-Ak ca. 45 min. je nach Angaben 1:200 bis 100 [80-90 µl / Objektträger]
- 3× kurz in PBS waschen (5, 3, 1 min.)
- Sekundär-Ak 1:100 45 min. [verdünnt in 1% FKS, 80-90 µl / Objektträger]
- 3× kurz in PBS waschen (5, 3, 1 min.)
- 10 bis 14 min. in Substrat\* stellen
- 2× kurz in Aqua dest.
- Hämalaun (1:3) 5 min. [100 ml Aqua dest. + 50 ml Hämalaun nach Mayer]
- In fließendem H<sub>2</sub>O bläuen
- Trocknen lassen
- Eindeckeln mit Glycerol Gelatine

*\*Erstellen des Substrats:*

- 0,2 M Essigsäure (angesetzt):
  - Eisessigsäure 11,49 ml
  - H<sub>2</sub>O ad 1,0 l
- 0,2 M Natriumacetat (angesetzt):
  - Natriumacetat \* 3 H<sub>2</sub>O 27,22 g
  - H<sub>2</sub>O ad 1,0 l

- 50 mM Acetat Puffer pH 5,2
  - 0,2 M Essigsäure 14,8 ml
  - 0,2 M Natriumacetat 35,2 ml
  - H<sub>2</sub>O ad 150 ml
  - 10 ml AEC-Lösung
  - 30 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 2.6 Die Abstoßungsklassifikation nach Billingham

Für die Beurteilung der Abstoßungsgrade des akuten Abstoßungsgeschehens wird die für Herztransplantationen international übliche Klassifikation der akuten Abstoßung nach Billingham herangezogen<sup>19; 58</sup>. Diese wurde in der Klinik für aus dem Endokard entnommene Biopsien entwickelt, bei denen dem Untersucher nur wenig Material zur Verfügung steht. Die für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen gewonnenen Schnitte liefern dahingegen jeweils einen Querschnitt durch das ganze Herz. Somit kann nie unifokales aggressives Infiltrat nachgewiesen werden, dass heißt, bei Beurteilung eines ganzen Herzens existiert Grad 2 (s.u.) nach Billingham nicht<sup>55</sup>.

- Grad 0: keine Abstoßung
- Grad 1A: fokale geringe Infiltration (perivaskulär oder interstitiell) ohne Myozytolysen
- Grad 1B: diffuse geringe Infiltration ohne Myozytolysen
- Grad 2: unifokale aggressive Infiltration und/oder fokale Myozytolysen (nur bei Biopsien)
- Grad 3A: multifokale aggressive Infiltrationen und/oder fokale Myozytolysen
- Grad 3B: diffuser Entzündungsprozess mit Myozytolysen
- Grad 4: diffuse Schädigung mit ausgeprägten Myozytolysen, evtl. auch Ödem, Hämorrhagien und Vaskulitis

Bei der Untersuchung der chronisch abgestoßenen Herzen kommt diese Einteilung der Abstoßungsgrade nicht zur Anwendung.

## 2.7 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 2.7.1 Agarose Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose Gelelektrophorese können DNS-Fragmente in einem elektrischen Feld zur Auftrennung gebracht werden. Die Nukleinsäuren wandern auf Grund ihrer negativen Ladung dabei zur Anode. Die einzelnen Fragmente werden ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei die Migrationsgeschwindigkeit zum inversen Logarithmus des Molekulargewichtes direkt proportional ist. Dem Agarosegel wird Ethidiumbromid zugefügt, das sich in die doppelsträngigen DNS Fragmente einlagern und durch UV-Licht bei einer Wellenlänge von 266 nm fluoreszieren kann.

#### Gelherstellung:

- TAE Puffer mit 2% Agarose versetzen und aufkochen lassen
- Nach Abkühlung Zugabe von Ethidiumbromid (5 µg/ml)
- Gel in eine Gelwanne gießen, Kämme einfügen und auspolymerisieren lassen

#### Elektrophorese:

- Gelwanne mit auspolymerisiertem Gel in Elektrophoreseapparatur einsetzen, TAE Puffer hinzugeben
- DNS-Proben mit Ladepuffer versetzen (1:5) und in Geltaschen pipettieren
- Durchführung der Elektrophorese bei 80-150 Volt (abhängig von Gelgröße)

#### Detektion der DNS-Fragmente:

- Gelblock im Eagle EYE II Geldokumentationssystem fotografieren (zur Darstellung kommen die mit Ethidiumbromid markierten doppelsträngigen DNS-Banden)
- Digitale Speicherung der Daten im Computer (Photoshop™) zur Dokumentation und Auswertung

### 2.7.2 RNS-Isolierung

Wie bereits unter 2.4.5.3 beschrieben, werden die entnommenen Herzen bis zu deren weiterer Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Bestimmung der Expression verschiedener Zyto- sowie Chemokinmuster der in das Infiltrat eingewanderten Entzündungszellen werden die Organe zunächst einer RNS-Isolierung unterzogen. Dabei wird in Anlehnung an die Methode von Chomczynski und Sacchi verfahren, bei der die Zellen durch Homogenisierung und Verwendung bestimmter Detergenzien aufgeschlossen werden. Guanidiniumthiocyanat zerstört zelluläre Strukturen, bewirkt die Denaturierung von Proteinen und inaktiviert die bei der Lyse von Zellen freigesetzten RNAsen. Durch saure Phenolextraktion kommt es zur Abtrennung der RNS von anderen Nukleinsäuren. Die einzelnen Schritte der gesamtzellulären RNS-Isolierung sind im folgenden Protokoll wiedergegeben:

- Gefrorenes Organ in 1 ml TRI-Reagenz\* aufnehmen
- Ca. 30 sek. mixen, um eine möglichst homogene Zerkleinerung des Organs zu erreichen
- 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zugeben und gut vortexen
- 15 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 15 min. bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 17000 U/min. zentrifugieren  
→ es bilden sich drei Phasen:
  - rote Phase = Organphase am Grund des Cups (Proteinphase)
  - farbloser Überstand = RNS-Phase
  - dazwischen sog. Interphase = DNS-Phase
- Farblosen Überstand abnehmen und 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol zugeben
- 10 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 10 min. bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 17000 U/min. zentrifugieren  
→ es bildet sich ein Pellet am Grund des Cups
- Überstand verwerfen
- 1 ml 75% Ethanol zugeben und gut vortexen
- 5 min. bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 7500 U/min. zentrifugieren
- Überstand verwerfen

- Pellet 5-10 min. unter dem Abzug lufttrocknen
- 100 µl DEPC- H<sub>2</sub>O zugeben
- Pellet 10 min. bei 55-60°C auflösen, gut vortexen

\*enthält Phenol und Guanidin-Thiocyanat (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA);

Die auf diese Weise erhaltene RNS wird nach photometrischer Vermessung (bei 260 nm) zu je 10 µg aliquotiert und bei -80°C zwischengelagert. Der Anteil der bei diesem Protokoll erhaltenen RNS liegt bei 40 bis 120 µg pro Herz mit hoher Reinheit (Quotient 260/280 nm > 1,6).

### 2.7.3 Ribonuklease Protektion Assay (RPA)

Das RPA ist eine geeignete Methode hoher Sensitivität und Spezifität zum quantitativen Nachweis von Ribonukleinsäure. Für die Durchführung des Assays wird das RiboQuant™ Kit verwendet und nach dem folgenden Protokoll des Herstellers verfahren (die Angaben beziehen sich jeweils auf 20 Proben):

#### RNase Protektion Assay:

- Benötigte Reagenzien auf Raumtemperatur bringen (dauert bei  $\alpha$ 33-UTP ca. ½ Stunde)
- Folgende Reagenzien in der genannten Reihenfolge in ein 1,5 ml ERG geben:
  - 1 µl RNasin
  - 1 µl GACU Pool
  - 2 µl DTT
  - 4 µl 5 x Transcription buffer
  - 1 µl RPA Template Set
  - 10 µl  $\alpha$ 33-UTP
  - 1 µl RNA Polymerase
- Durch sanftes Pipettieren mixen und quick spin (max. Drehzahl)
- 1 h bei 37°C inkubieren
- Terminieren der Reaktion durch Zugabe von
  - 2 µl RNase freie DNase
- Durch sanftes Pipettieren mixen und quick spin (max. Drehzahl)

- 30 min bei 37°C inkubieren
- Zugabe der folgenden Reagenzien in der genannten Reihenfolge:
  - 26 µl 20 mM EDTA
  - 25 µl Tris-saturated Phenol
  - 25 µl Chloroform:Isoamlyalkohol (50:1)
  - 2 µl Yeast tRNA
- Kurz vortexen (→ Emulsion) und zentrifugieren (13000 U/min., RT, 5 min.)
- Obere flüssige Phase in neues ERG überführen und Zugabe von
  - 50 µl Chloroform:Isoamlyalkohol (50:1)
- Kurz vortexen und zentrifugieren (13000 U/min., RT, 2 min.)
- Obere flüssige Phase in neues ERG überführen und Zugabe von
  - 50 µl 4 M Ammoniumacetat
  - 250 µl Ethanol 100% (-20°C)
- Inkubation (60 min., -80°C)
- Zentrifugieren (17000 U/min., 4°C, 15 min.)
- Überstand verwerfen und Zugabe von
  - 100 µl Ethanol 90% (-20°C)
- Zentrifugieren (17000 U/min., 4°C, 5 min.)
- Überstand vorsichtig abnehmen und 10 –15 min. lufttrocknen
- Zugabe von
  - 50 µl Hybridisierungspuffer
- Pellet durch sanftes Vortexen (20 sek.) lösen und quick spin
- Szintiflüssigkeit in 2 Szintiröhrchen (pro angesetztem Template), je 1 µl und 2 µl des Templates in Szintiflüssigkeit aufnehmen und Radioaktivität vermessen  
→ Einstellen des Templates mit Hybridisierungspuffer auf benötigte cpm/µl
- Zu jedem Aliquot der RNA-Proben (s. 2.2.2, in 8 µl Hybridisierungspuffer vorliegend), zu jeder mouse control (mc = Positivkontrolle; 2 µl Mouse Control + 6 µl Hybridisierungspuffer) und yeast tRNA-control (yc = Negativkontrolle; 2 µl yeast tRNA + 6 µl Hybridisierungspuffer) 2 µl eingestelltes Template geben
- Durch Pipettieren mischen, jede Probe mit einem Tropfen Mineralöl bedecken, quick spin
- Auf Heizblock (90°C) geben, Heizblock dann sofort auf 56°C abkühlen

- Über Nacht (~ 12-16 Stunden) bei 56°C hybridisieren
- Heizblock auf 37°C herunterkühlen
- RNase Cocktail vorbereiten:
  - 2,5 ml RNase Puffer
  - 6 µl RNase A + T1 Mix
- Proben vom Heizblock nehmen und jeweils 100 µl des RNase Cocktails unter das Öl geben
- Quick spin, Inkubation (45 min., 30°C)
- Proteinase K Cocktail vorbereiten:
  - 390 µl Proteinase K Puffer
  - 30 µl Proteinase K
  - 30 µl yeast tRNA
- Kurz vortexen, je 18 µl des Proteinase K Cocktails in neuen und nummerierten ERG's vorlegen; Probe unter dem Öl abpipettieren (Öl vermeiden) und zum vorgelegten Proteinase K Cocktail geben
- Kurz vortexen, quick spin, Inkubation (15 min., 37°C)
- Zugabe von
  - 65 µl Tris-saturated Phenol
  - 65 µl Chloroform:Isoamylalkohol (50/1)
- Zu einer Emulsion vortexen, zentrifugieren (13000 U/min., 5 min., RT)
- Obere wässrige Phase abnehmen und in ein neues ERG geben
- Zugabe von
  - 120 µl 4 M Ammonium Acetat
  - 650 µl Ethanol 100%
- Fällern (60 min., -80°C), zentrifugieren (17000 U/min., 4°C, 15 min.)
- Überstand verwerfen und Zugabe von
  - 100 µl Ethanol 90%
- Zentrifugieren (17000 U/min., 4°C, 5 min.), Überstand abnehmen
- Lufttrocknen der Pellets 10 – 15 Minuten
- Vorbereitung der Größenstandards
  - 1 µl eingestelltes Template + 6 µl Hybridisierungspuffer
  - davon 1 µl in 6 µl Hybridisierungspuffer (neues Cup) aufnehmen

- davon 4  $\mu\text{l}$  in 6  $\mu\text{l}$  Loadingbuffer (Standard 1) und 2  $\mu\text{l}$  in 8  $\mu\text{l}$  Loadingbuffer (Standard 2) aufnehmen

- Zugabe von  
    5  $\mu\text{l}$  1 x Loadingbuffer
- 2 – 3 Minuten vortexen (um Pellet aufzulösen), quick spin
- 2 – 3 Minuten auf Heizblock bei 90°C, dann sofort auf Eis abkühlen
- Proben auf Gel auftragen
- Proben ca. 2 h bei 50 Watt laufen lassen
- Gel auf Blottingpapier auflegen, anschließend 2 Stunden in Gelrockner legen
- Gel in Phosphoimagerkassette legen und etwa 3-4 Tage entwickeln lassen

### Herstellung des Polyacrylamidgels:

- 5%ige Acrylamid-Lösung:  
    8,85 ml Acrylamid 40%  
    9,31 ml Bis-Acrylamid 2%  
    7,45 ml 10  $\times$  TBE  
    35,82 g Urea  
    ad 74,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Bei 37°C im Wasserbad lösen, anschließend abkühlen lassen;

Vor dem Gießen des Gels (unmittelbar davor) Zugabe von

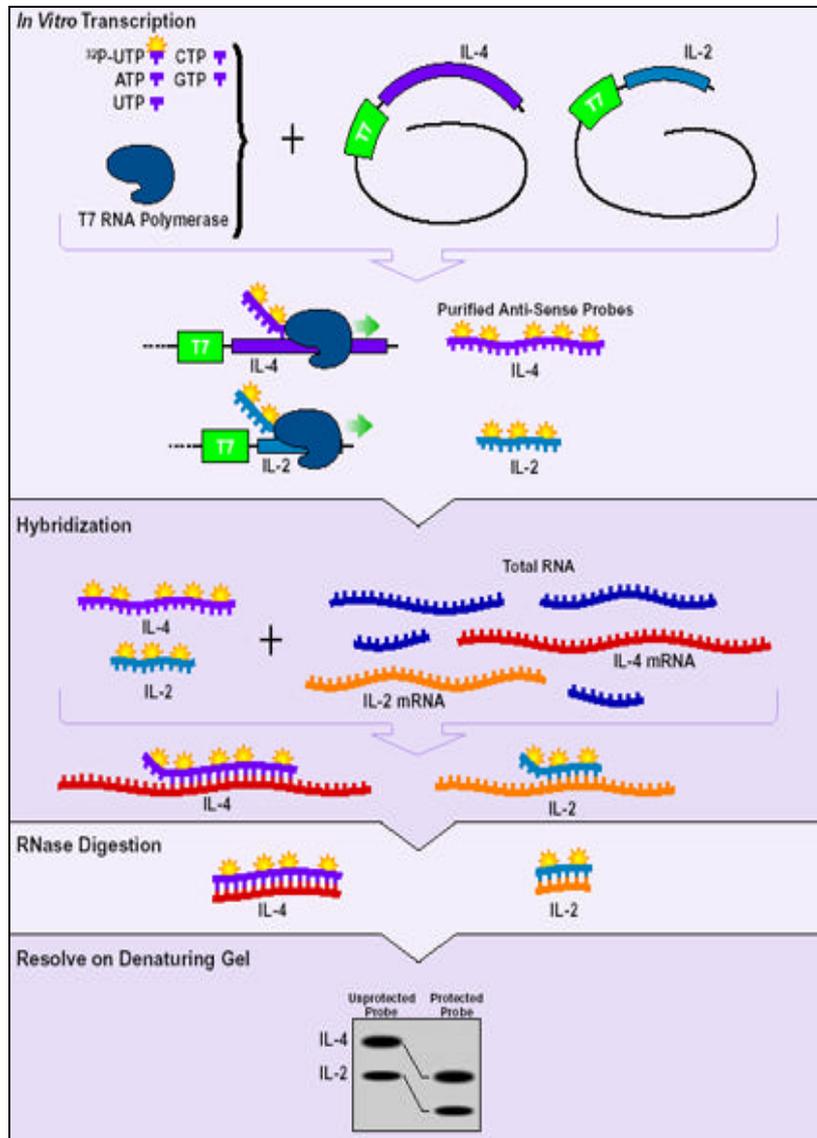
- 900  $\mu\text{l}$  Ammoniumpersulfat 10%
- 110  $\mu\text{l}$  TEMED

Anschließend wird die Lösung luftblasenfrei in ein vorbereitetes Gelsystem gegossen und polymerisiert etwa eine Stunde lang aus.

### Elektrophorese:

- Gelplatten (mit erstarrtem Gel) in das vertikale Elektrophoresesystem einsetzen
- Gelkammern mit 0,5  $\times$  TBE Puffer füllen
- Geltaschen gründlich spülen
- Vorlaufzeit: 45 min. bei 40 Watt
- Auftragen der in Ladepuffer gelösten Proben in die Geltaschen
- Elektrophorese 10 min. bei 25 Watt, die restliche Zeit bei 50 Watt

In *Abbildung 4* ist der schematische Ablauf einer RPA wiedergegeben. Zu einem bestimmten Template Set, das einem Gemisch verschiedener DNS-Sequenzen unterschiedlicher Länge entspricht, werden im Überschuss die als Triphosphate vorliegenden vier Kernbasen Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil gegeben.



**Abb.4:** Schematische Darstellung eines Ribonuklease Protektion Assay (entnommen aus *Instruction Manual, 5th Edition, RiboQuant®, Multi Probe RNase Protektion Assay System; Pharmingen, San Diego, USA*);

Die Matrizen des Template Sets sind an einen Promotor gebunden (T7, s. *Abb.4*) und kodieren für diejenigen Proteine, die in den einzelnen Proben der Herztransplantate nachgewiesen werden sollen. Neben den Basen wird zudem  $\alpha^{32}\text{P}^*$ -markiertes Uraciltriphosphat sowie DNS-abhängige RNS-Polymerase (T7-RNS-Polymerase) zugegeben. Die Polymerase bindet nun an den Promotor des jeweiligen Templates (RNS-Sequenz) und transkribiert in vitro das DNS-Template in die entsprechende antisense RNS. Dadurch

entstehen mit  $\alpha^{32}\text{P}^*$  markierte, radioaktive RNS-Sequenzen, die im Anschluss daran mit der aus den Herzen isolierten RNS über Nacht inkubiert werden. Es bilden sich - neben in Einzelsträngen vorliegender RNS - mit den jeweils korrelierenden RNS-Sequenzen der Proben doppelsträngige RNS-Abschnitte, die dadurch vor dem folgenden Verdau durch zugegebene RNase geschützt sind. Die Doppelstränge werden durch Erhitzen wieder aufgespalten. Sie können durch Elektrophorese in einem Polyakrylamidgel ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Es bilden sich Banden, die durch Autoradiographie (antisense  $\alpha^{32}\text{P}^*$  markierte RNS) nachgewiesen und entsprechend ihrer Lage auf dem Gel und ihrer Densität qualitativ wie quantitativ ausgewertet werden können (Storm 840 Phosphoimager, Image Quant Software).

### 2.7.4 Reverse Transkriptase PCR

Ein weiteres Verfahren zum Nachweis von Chemokin mRNA in Herztransplantaten stellt die RT-PCR dar. Ihr Vorteil besteht darin, dass sie auf Grund der Amplifizierung spezifischer Sequenzen auch bei Zyto- bzw. Chemokinen eingesetzt werden kann, deren Transkription nur äußerst schwach ausgeprägt ist. Zur Anwendung der Technik ist es notwendig, jeweils kurze Sequenzen an jedem Ende des zum Kopieren vorgesehenen cDNA Fragments (Synthese *s.2.7.4.1*) zu kennen, um so die Auswahl des spezifischen Olinukleotid-Primerpaares bestimmen zu können. Die Bandenintensitäten der einzelnen cDNA Präparationen werden im Anschluss an die Gelelektrophorese miteinander verglichen. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die ursprünglich vorliegende Menge an mRNA der jeweiligen Proben. Als Kontrolle wird von jeder cDNA zusätzlich eine  $\beta$ -Aktin PCR durchgeführt. Bei  $\beta$ -Aktin handelt es sich um eine ubiquitär in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimierte mRNA (sog. „housekeeping gene“). Die verwendeten Primersequenzen stammen aus verschiedenen Exons, wodurch etwaige Verunreinigungen mit chromosomaler DNA ausgeschlossen werden können. Durch die  $\beta$ -Aktin PCR kann die Menge an cDNA der verschiedenen Proben sowie deren Qualität überprüft werden.

### 2.7.4.1 cDNS-Synthese

Die relative Menge einer mRNA kann nach Umschreiben der mRNA in die komplementäre DNS (cDNS) durch die Polymerasekettenreaktion ermittelt werden. Dieser Prozess geschieht mit Hilfe des retroviralen Enzyms reverse Transkriptase. Die spezifische reverse Transkription von mRNA ist durch den Einsatz von Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primern gewährleistet, da diese an den der mRNA eigenen Poly-A-Schwanz binden. Außerdem wird dem Ansatz ein „random-hexamer“-Primer zugesetzt. Die Durchführung der cDNS-Synthese erfolgte unter Verwendung des First Strand cDNS Synthesis Kit nach folgendem Protokoll:

#### Reaktionsansatz:

2 µg RNA	8 µl
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer	1 µl
random-hexamer Primer	1 µl
Transkriptionspuffer	4 µl
DTT	2 µl
dNTP-Mix (200µM)	2 µl
RNAsin	0,5 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

#### Durchführung:

- 2 µg RNS mit DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auffüllen
- Primer dazugeben, vortexen
- 10 min. bei 70°C inkubieren und anschließend auf Eis abkühlen
- Puffer, DTT, dNTP's, 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

### 2.7.4.2 Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) stellt eine einfache und schnelle Methode dar, zahlreiche Kopien spezifischer DNS-Sequenzen zu erhalten. Die Methode beruht auf der wiederholten Hitzedenaturierung der als Ausgangsmaterial vorliegenden doppelsträngigen DNS mit anschließender Wiederherstellung der Einzelstränge unter Abkühlung. Hierbei hybridisiert jeweils ein in großem Überschuss vorhandener Primer („annealing“) mit dem 5'-Ende bzw. dem 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz. Der Zusatz einer thermostabilen DNS-Polymerase und allen vier Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (A, C, T, G) bewirkt die Synthese des neuen Komplementärstranges. In zahlreichen Zyklen erhält man nach wiederholter DNS-Fragmentierung, Primerhybridisierung und DNS-Synthese große Mengen der gewünschten DNS-Sequenz.

#### Reaktionsansatz:

c DNS	2 $\mu$ l
Primer 1 (sense)	1 $\mu$ l
Primer 2 (antisense)	1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR Puffer	5 $\mu$ l
dNTP-Mix	10 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 $\mu$ l

#### Durchführung:

- Reaktionsansatz auf Eis in einzelne ERG's geben und durch Pipettieren sorgfältig mischen
- Mit 50  $\mu$ l Mineralöl beschichten, um Verdampfen des Ansatzes während der PCR zu vermeiden
- Reaktionszyklen:

Die PCR-Reaktionsbedingungen mussten zunächst durch Austesten verschiedener Reaktionspuffer, Primerhybridisierungszeiten sowie -temperaturen standardisiert werden. Die PCR's wurden für die jeweiligen Proben unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

## Material und Methode

**b-Aktin:** (Puffer: 10 × Puffer 15 mM)

**CCR4:** (Puffer: 10 × Puffer 20 mM)

Funktion	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur
DNS-Denaturierung	5 min.	94°C	5 min.	94°C
DNS-Denaturierung	45 sec.	94°C	1 min..	94°C
Primer-Hybridisierung	30 sec.	60,2°C	30 sec.	64°C
Primerverlängerung	1 min. 30 sec.	72°C	1 min. 15 sec.	72°C

**MDC:** (Puffer: 10 × Puffer 15 mM)

**TARC:** (Puffer: 10 × Puffer 20 mM)

Funktion	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur
DNS-Denaturierung	5 min.	94°C	5 min.	94°C
DNS-Denaturierung	1 min.	94°C	1 min.	94°C
Primer-Hybridisierung	30 sec.	58,5°C	30 sec.	55°C
Primerverlängerung	1 min. 30 sec.	72°C	1 min.	72°C

- Auftragen von 20 µl des Ansatzes auf ein 2%iges Agarosegel mit anschließender Gelelektrophorese
- Darstellung der durch das zugegebene Ethidiumbromid detektierten mRNS Banden am Eagle EYE II Geldokumentationssystem

## 2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Log Rank Test.

## 2.9 Gruppeneinteilung

In den einzelnen Gruppen werden zur Erstellung der Überlebenskinetik wenigstens sieben Mäuse operiert. Zusätzlich werden zu verschiedenen Zeitpunkten post transplantationem mindestens drei Herzen innerhalb der interessanten Gruppen explantiert. Je nach Ergebnis werden die Versuchszahlen für genauere Aussagen entsprechend erhöht. In anderen Grup-

pen wird wegen mangelnder Aussagekraft auf die Durchführung einzelner Versuche verzichtet (Tab.1).

Gruppe	Syngene Kontrolle	Allogene Kontrolle akute Abst.	Allogen CCR4 <sup>-/-</sup> Akute Abst.	Allogene Kontrolle Chron. Abst.	Allogen CCR4 <sup>-/-</sup> Chron. Abst.	Allogen Kontrolle Chron. Abst.	Allogen CCR4 <sup>-/-</sup> Chron. Abst.
Spender	C57BL/6	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c
Empfänger	C57BL/6	C57BL/6	CCR4 <sup>-/-</sup>	C57BL/6	CCR4 <sup>-/-</sup>	C57BL/6	CCR4 <sup>-/-</sup>
Therapie	ohne Therapie	ohne Therapie	ohne Therapie	GN I	GN I	GN II	GN II
Kinetik n=	7	7	11	9	8	32	23
Ex nach 5d n=	3	5	3	n.d.	n.d.	3	3
Ex nach 30d n=	n.d.	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	4	3
Ex nach 60d n=	4	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	6	3
Summe n=	14	12	14	9	8	45	32

**Tab. 1:** Gruppenübersicht

*n.d.:* nicht durchgeführt

*n.m.:* nicht möglich, d.h. in den Gruppen konnte ein Überleben der Transplantate unter den jeweils angegebenen Versuchsbedingungen nicht erreicht werden.

*GN I:* 10 mg/kg KG Galliumnitrat

*GN II:* 30 mg/kg KG Galliumnitrat

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswirkungen des CCR4-Defekts in vivo

##### 3.1.1 Auswirkungen des CCR4-Defekts im akuten Modell

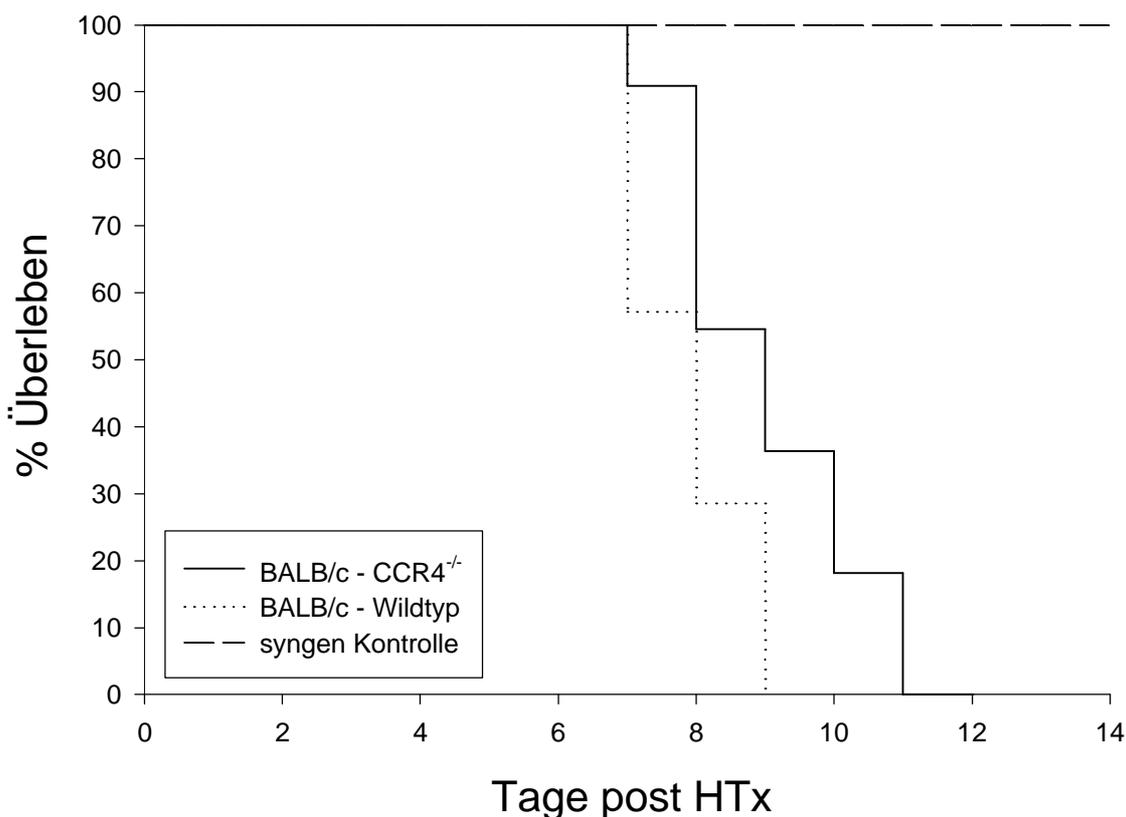


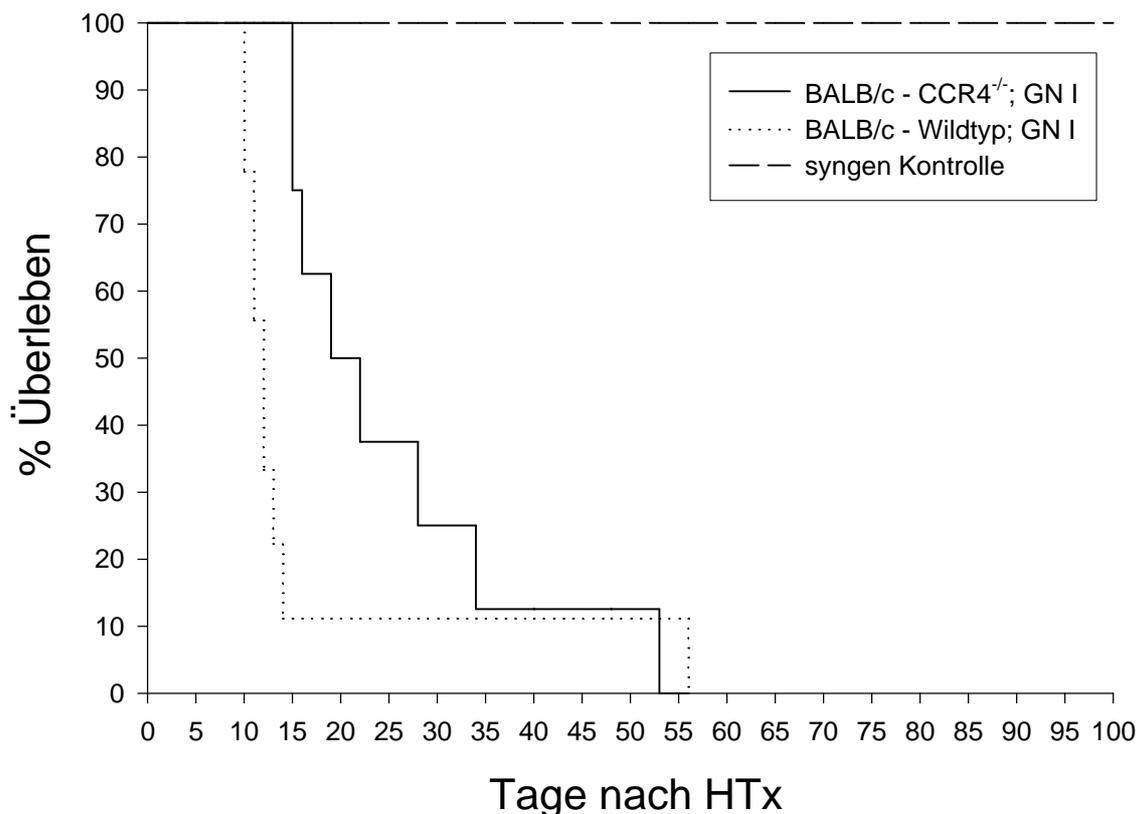
Abb.5: Transplantatüberleben im akuten Modell

Zunächst sollte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust des transplantierten Herzens nicht etwa auf die mikrochirurgische Operationstechnik zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden syngene Kontrollen (C57BL/6 → C57BL/6) operiert, bei denen in jedem Fall indefinitives Transplantatüberleben erzielt werden konnte (n=7). Transplantierte Herzen von vollallogenen Spendern (BALB/c) auf Empfängertiere ohne CCR4-Defekt (C57BL/6, CCR4<sup>+/+</sup>) wurden nach 7-9 Tagen abgestoßen, im Mittel nach 7,86 Tagen (n=7). Bei CCR4 defizienten Empfängertieren (C57BL/6, CCR4<sup>-/-</sup>) kam es zur Abstoßung

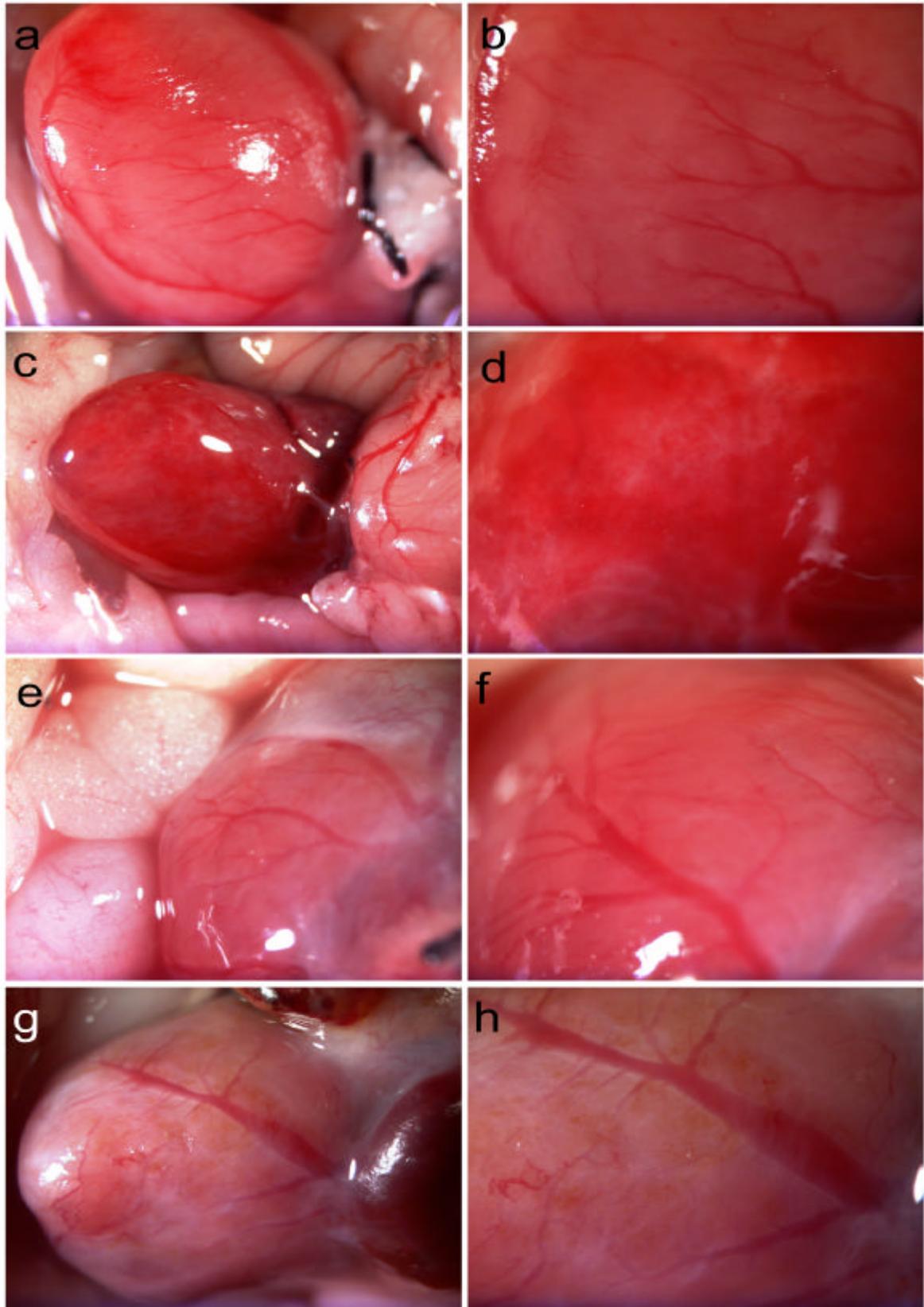
des vollallogenen Transplantates nach 7-11 Tagen, durchschnittlich nach 9 Tagen (n=11, p=0,515, *Abb.5*).

Die makroskopische Untersuchung der Herzen in situ ließ ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede zwischen CCR4<sup>+/+</sup> und CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen zu. In beiden Gruppen sind sieben Tage nach Transplantation deutliche Zeichen der Abstoßung festgestellt worden. Neben zahlreichen Hämorrhagien sind bei vielen Herzen darüber hinaus bereits Infarzierungen aufgetreten. Diese morphologischen Veränderungen führten zu funktionellen Einbußen der Herzen, oft dominierten arrhythmische Kontraktionen die Herzaktionen (*Abb.7*). Das Fehlen des CCR4-Rezeptors führt demnach im Rahmen der akuten Abstoßungsreaktion nicht zu einer biologisch relevanten Verlängerung des Transplantatüberlebens.

### 3.1.2 Auswirkungen des CCR4-Defekts nach vollallogener Transplantation im chronischen Modell

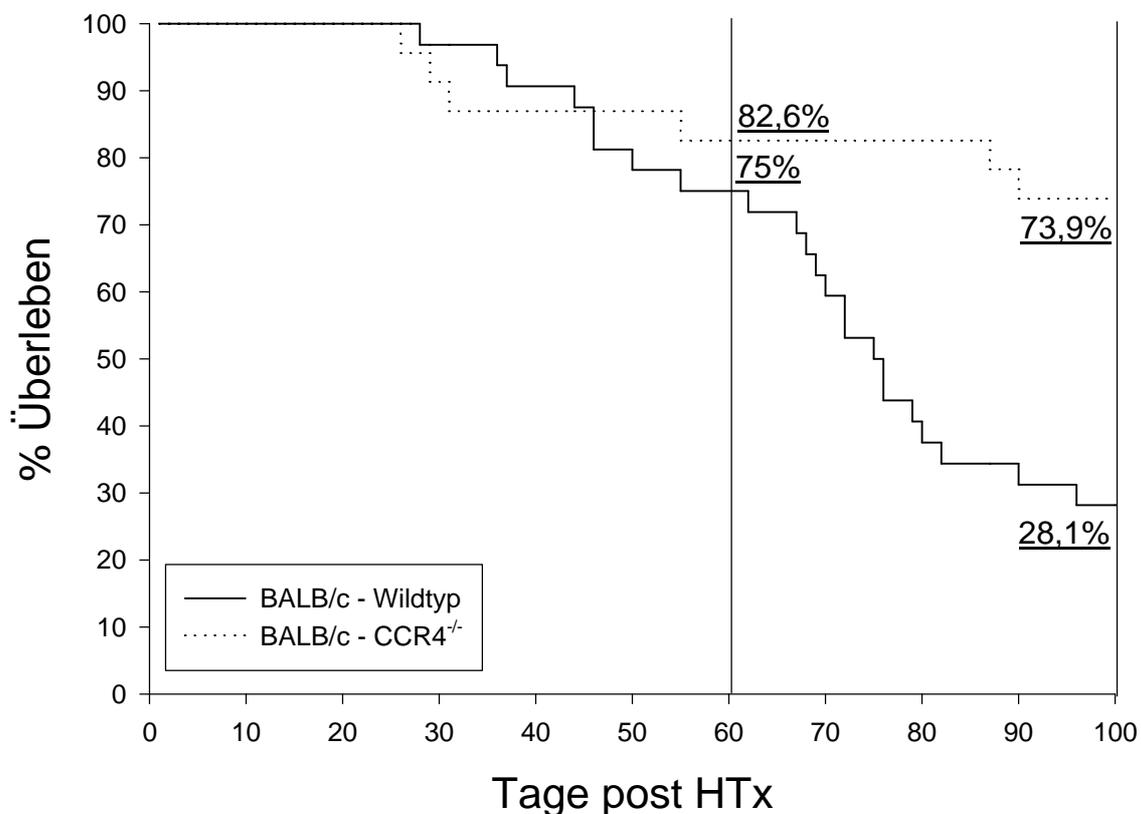


**Abb.6:** Induktion des chronischen Transplantatversagens unter Therapie mit 30 mg GN/kg KG am Tag der Operation sowie am 3. postoperativen Tag, gefolgt von 10 mg GN/kg KG jeden weitere dritten Tag bis Tag 30 (GN I);



**Abb.7:** Übersicht der heterotop transplantierten Herzen; syngene Kontrolle (C57BL/6 - C57BL/6) 7 Tage post HTx (a,b), BALB/c - CCR4<sup>-/-</sup> akute Abstoßung 7 Tage post HTx (c,d), syngene Kontrolle (C57BL/6 - C57BL/6) 100 d post HTx (e,f), BALB/c - CCR4<sup>-/-</sup> chronische Abstoßung 100 d post HTx (g,h); Aufnahmen bei 8-facher (a,c,e,g) bzw. 16-facher Vergrößerung (b,d,f,h);

Für die Generierung eines chronischen Abstoßungsmodells war es notwendig, den initial stattfindenden akuten Abstoßungsprozess zu unterdrücken. Als geeignetes Immunsuppressivum wurde den Mäusen Galliumnitrat in einem festgelegten Therapieschema subkutan injiziert. Begonnen wurde mit der Verabreichung von 30 mg/kg KG am Tag der Operation sowie am dritten postoperativen Tag. Bis einschließlich Tag 30 wurden jeden weiteren dritten Tag 10 mg/kg KG appliziert (Abb.6). Die transplantierten Herzen der vollallogenen Kontrollgruppen (CCR4<sup>+/+</sup>) wurden in einem Zeitraum zwischen 10 und 56 Tagen abgestoßen (n=9). Die Abstoßung bei Empfängertieren mit CCR4-Defekt fand nach 15 bis 53 Tagen statt (n=8). Die verabreichte Dosis reichte also sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen nicht aus, den Abstoßungsprozess über den 60. postoperativen Tag hinaus zu verlängern, der als Zeitraum für die Entstehung eines chronischen Abstoßungsverhaltens im Experiment festgesetzt wurde. Dennoch zeigte sich im Vergleich beider Gruppen bereits unter suboptimalen Therapiebedingungen - trotz Fehlens einer statistischen Signifikanz - die Tendenz einer zeitlich verzögerten Transplantatabstoßung bei CCR4-defizienten Mäusen (p=0,087).



**Abb.8:** Induktion des chronischen Transplantatversagens unter Therapie mit 30 mg GN/kg KG am Tag der Operation sowie am ersten bis dritten postoperativen Tag, gefolgt von 30 mg GN/kg KG jeden weiteren zweiten Tag bis Tag 30 (GN II);

Im Rahmen einer weiteren Untersuchung wurden entsprechend höhere Dosen gewählt. Die Empfängertiere wurden am Tag der Operation bis einschließlich Tag drei täglich mit 30 mg/kg KG behandelt. Daran schloss sich die Applikation von Galliumnitrat in gleicher Dosierung jeden weiteren zweiten Tag bis einschließlich Tag 30 an. Dies führte zu einem deutlich verzögerten Abstoßungsverhalten der Herztransplantate sowohl bei den CCR4<sup>+/+</sup> Kontrollen als auch bei den CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen. Bei den vollallogenen Kontrollen kam es nach 28-100 Tagen (100 Tage entsprechen dem Ende des Versuchs) zum Transplantatversagen (n=32), die CCR4<sup>-/-</sup> Mäuse stießen die Herzen nach 26-100 Tagen ab (n=23). Durch die Applikation von Galliumnitrat konnte also bei ausreichend hoch gewählter Dosierung eine signifikante Verlängerung des Transplantatüberlebens erzielt werden.

In einem Vergleich zwischen CCR4<sup>+/+</sup> und CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen bezüglich der Kinetik des chronischen Transplantatversagens konnte ebenfalls ein deutlicher Unterschied festgestellt werden (*Abb.8*). Nach einem Zeitraum von 60 Tagen ließ sich noch bei 75% der Kontrolltiere eine Herzaktion verifizieren, wohingegen bei den CCR4-defizienten Mäusen zum gleichen Zeitpunkt 82,6% der Transplantate schlugen. Dieser Unterschied zwischen beiden Gruppen im chronischen Abstoßungsmodell wurde bei der Untersuchung der Herzen 100 Tage post transplantationem noch deutlicher. So konnte für die CCR4<sup>-/-</sup> Mäuse in 73,9% der Fälle eine weiterhin bestehende Herzaktion gesichert werden, bei den CCR4<sup>+/+</sup> Mäusen schlugen die Herzen dahingegen nur noch in 28,1% der Fälle (p=0,0034).

Bei makroskopischer Untersuchung der Transplantate in situ 60 Tage nach Transplantation ließen sich jedoch keine Unterschiede zwischen Kontroll- und CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen nachweisen. Die Herzen waren zum Großteil stark induriert, fibrotische Areale der Herzwände und Lumenveränderungen der Herzkranzgefäße dominierten das Erscheinungsbild (*Abb.7*), insgesamt war das Herz gegenüber akut abgestoßenen Transplantaten deutlich verkleinert. Vereinzelt ließen sich arrhythmische Kontraktionen feststellen. In allen Fällen waren die Vorhöfe thrombosiert und standen weit von den Ventrikeln ab.

Durch die tägliche Dokumentation der Kontraktionsstärke (0+ bis +++) der Herzen sollte geprüft werden, ob sich aus deren palpatorischem Befund eventuell Rückschlüsse auf das weitere Abstoßungsgeschehen – die Kinetik betreffend – ziehen ließen. Bei Herzen, deren Kontraktionsstärke bereits zu einem frühen Zeitpunkt (7-10 Tage) zurückging, konnte nicht gleichzeitig ein frühzeitiges Transplantatversagen vorhergesagt werden. Umgekehrt war ein lang nachzuweisender starker Impuls der Herzen (+++) nicht Garant für die

Kontraktion der Herzen über den 60. oder sogar 100. Tag nach Transplantation hinaus  
(Daten nicht dargestellt).

### 3.1.3 Zusammenfassung der Überlebenskinetik in den Gruppen

Tabelle 2 zeigt einen Überblick über das Transplantatüberleben in den einzelnen Gruppen:

Gruppe	Therapie	Abstoßung (Tage)	Mittleres Überleben (±Standardfehler)	P
syngene Kontrolle	ohne Therapie	>100, >100, >100, >100, >100, >100, >100;	>100, ±0	
allogene Kontrolle Akute Abst.	ohne Therapie	7, 7, 7, 8, 8, 9, 9;	7,86 ±0,34	
allogen CCR4 <sup>-/-</sup> Akute Abst.	ohne Therapie	7, 8, 8, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11	9 ±0,40	vs. allo Ko akute Abst. p=0,051
allogene Kontrolle Chron. Abst.	GN I	10, 10, 11, 11, 12, 12, 13, 14, 56;	16,56 ±4,95	
allogen CCR4 <sup>-/-</sup> Chron. Abst.	GN I	15, 15, 16, 19, 22, 28, 34, 53;	25,25 ±4,63	vs. allo Ko chron. A., GN I p=0,087
allogen Kontrolle Chron. Abst.	GN II	28, 36, 37, 44, 46, 46, 50, 55, 62, 67, 68, 69, 70, 72, 72, 75, 76, 76, 79, 80, 82, 90, 96, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100;	n.d.	
allogen CCR4 <sup>-/-</sup> Chron. Abst.	GN II	26, 29, 31, 55, 87, 90, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100;	n.d.	vs. allo Ko chron. A., GN II p=0,0034

**Tab. 2:** Übersicht des Transplantatüberlebens in den einzelnen Gruppen

GN I: 10 mg/kg KG Galliumnitrat

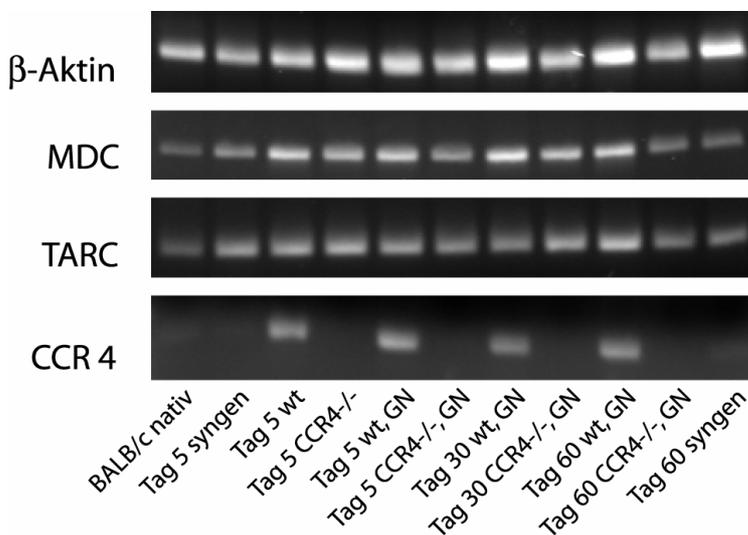
GN II: 30 mg/kg KG Galliumnitrat

### 3.2 Auswirkungen des CCR4-Defekts ex vivo

#### 3.2.1 Untersuchung der Chemokin- bzw. CCR4-Expression in Herztransplantaten mittels RT-PCR

In nativen sowie in heterotop transplantierten Herzen ist zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation die Expression von CCR4 mRNA sowie seiner Liganden MDC und TARC untersucht worden (Abb.9). Gleichzeitig ist für alle Präparationen eine  $\beta$ -Aktin PCR durchgeführt worden, die als interner Standard zur Überprüfung der jeweiligen cDNS-Menge diente.

In allen heterotop transplantierten Herzen konnte MDC sowie TARC mRNA nachgewiesen werden. Die Transkription beider Chemokine in nicht transplantierten, nativen Herzen war dagegen deutlich vermindert. Für die einzelnen Präparationen der heterotop transplantierten Herzen ließ sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der MDC- und TARC-Transkription feststellen. Sowohl in den syngen Kontroll- als auch den allogenen Wildtyp- wie knock out-Gruppen lag deren Expression auf etwa gleichem Niveau.



**Abb.9:** Darstellung der mRNA Expression für CCR4 und seine Liganden MDC und TARC. Als interner Standard wurde für jede cDNS eine  $\beta$ -Aktin PCR (konstitutiv exprimierte mRNA in allen eukaryotischen Zellen) durchgeführt.

CCR4 mRNA ließ sich dagegen kaum in den 5-Tage sowie 60-Tage syngen Kontrollen nachweisen, ebenso waren in nativen BALB/c sowie C57BL/6 (nicht dargestellt) Herzen kaum Anzeichen einer CCR4 Expression festzustellen. Die an unterschiedlichen Tagen nach Transplantation aus CCR4<sup>+/+</sup> Empfängern explantierten Organe zeigten unabhängig vom Entnahmezeitpunkt alle eine deutliche CCR4-Transkription, es ließ sich aber keine

bzw. eine nur sehr geringe Expression der Chemokinrezeptor 4 mRNA in den entsprechenden Transplantaten bei CCR4-defizienten Empfängern nachweisen.

### 3.2.2 Untersuchungen von Zytokin- und Chemokinexpressionen in Herztransplantaten mittels Ribonuklease Protektion Assay

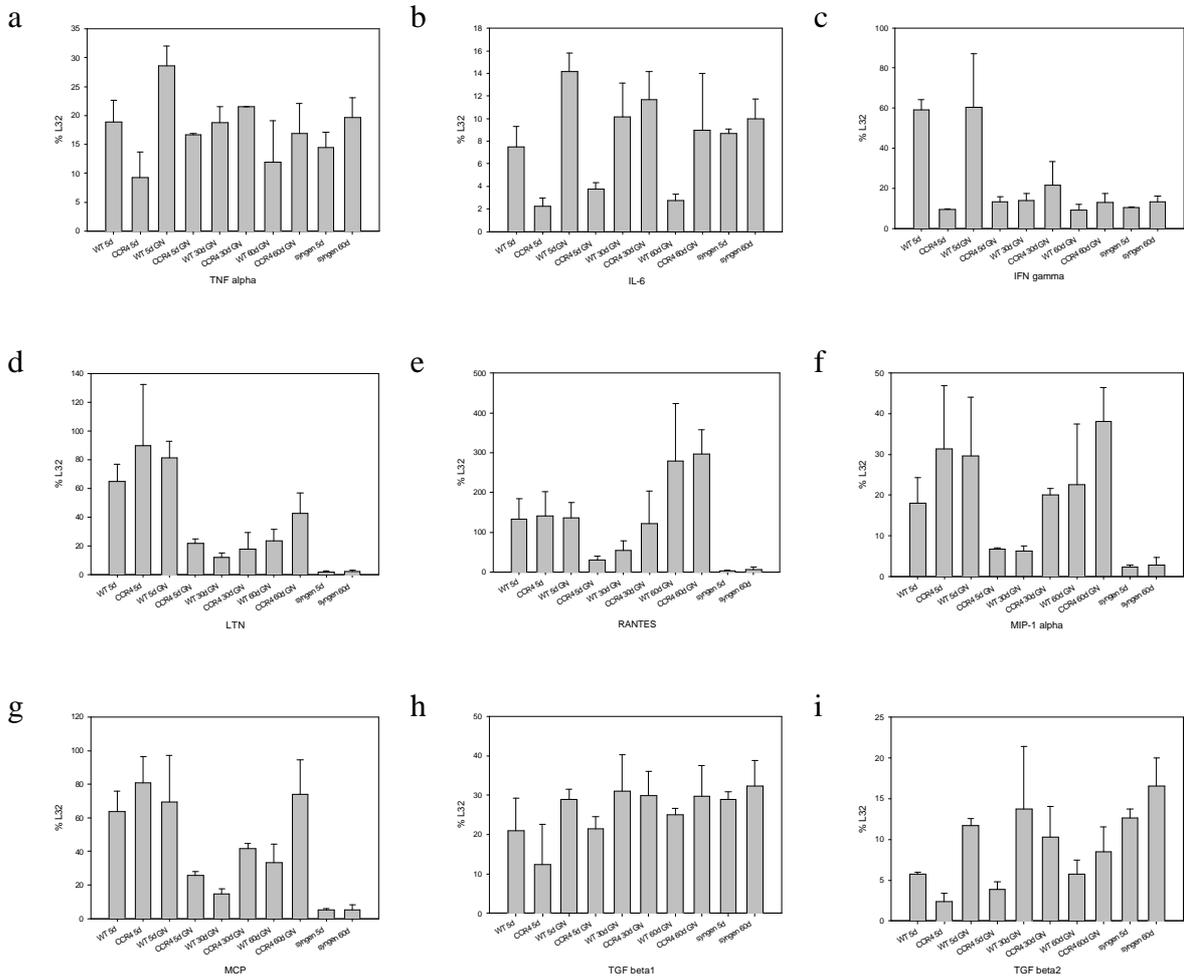
Das Ribonuklease Protektion Assay (RPA) wurde mit dem Template Set mck3b sowie mck5b des Herstellers PharMingen durchgeführt. Damit wurden die im Folgenden angegebenen Zyto- bzw. Chemokine erfasst:

<u>Template-Set mck3b:</u>	TNF- $\beta$	<u>Template-Set mck5b:</u>	LTN
	LT- $\beta$		RANTES
	TNF- $\alpha$		MIP-1 $\beta$
	IL-6		MIP-1 $\alpha$
	IFN- $\gamma$		Eotaxin
	TGF- $\beta$ 1		MIP-2
	TGF- $\beta$ 2		MCP
	TGF- $\beta$ 3		
	MIF		

Die Intensitäten der einzelnen Banden wurden in Relation zur Bande der RNS für L32 gemessen. L32 wird als so genanntes „housekeeping gene“ in bzw. auf allen Zellen in etwa gleicher Menge exprimiert und ermöglicht damit - unabhängig von der zur Verfügung stehenden Gesamt-RNS der einzelnen Proben - die Auswertung der Zyto- bzw. Chemokin-RNS.

Die Bewertung der gemessenen Zyto- bzw. Chemokin mRNA-Expressionen der verschiedenen Herztransplantate erwies sich jedoch als schwierig. So waren die gemessenen Signale, exemplarisch an LTN (v.a. bei CCR4<sup>-/-</sup>, 5 d ohne GN-Medikation) und an MIP-1 $\alpha$  (v.a. CCR4<sup>-/-</sup>, 5 d und Wildtyp, 5 d mit GN-Medikation, *Abb.10*) gezeigt, äußerst schwankend. Ein Beleg dafür sind die großen Standardabweichungen. In allogenen Herzen ist die verstärkte Transkription einiger proinflammatorischer Zyto- sowie Chemokine (v.a. IFN- $\gamma$ ,

LTN, RANTES, MIP-1 $\alpha$ ) im Vergleich zur syngenem Kontrollgruppe jedoch deutlich nachzuweisen.



**Abb.10:** Darstellung der Menge transkribierter mRNA verschiedener proinflammatorischer Zyto- bzw. Chemokine unter Verwendung des RNase Protektion Assay. Die Bandenintensitäten der entsprechenden RNS-Sequenzen werden in Relation zur RNS-Expression von L32 angegeben. Die Entnahme der Transplantate erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Es wurden drei Proben pro Gruppe ausgewertet (CCR4 = knock out Gruppe, wt = CCR4<sup>+/+</sup> Gruppe).

Unterschiede im Transkriptionsverhalten von IFN- $\gamma$ , das unter anderem von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen produziert wird und neben der Aktivierung von Endothelzellen bzw. Makrophagen auch eine verstärkte Expression von MHC-Molekülen bewirkt, waren vor allem kurz nach der Transplantation zu sehen. Die Spiegel von IFN- $\gamma$  waren in allogenen Herzen, die in CCR4-defiziente Empfänger transplantiert wurden, im Vergleich zu den allogenen Wildtypempfängern deutlich, teilweise sogar bis auf das Niveau der syngenem Kontrolle reduziert. Im chronischen Abstoßungsverhalten konnten keine Unterschiede einer IFN- $\gamma$ -Expression festgestellt werden. Eine detaillierte Bewertung der gewonnenen

Ergebnisse war jedoch schwierig. So lagen die mRNA-Spiegel von TNF- $\alpha$  oder IL-6 (ebenfalls proinflammatorisch wirkende Zytokine) trotz ihrer Unterschiede zwischen Wildtyp- und knock out Empfänger während der akuten Phase deutlich im oder sogar unter dem Niveau der syngenen Kontrolle. Sie können demzufolge nicht als hochreguliert bewertet werden. Ebenso lag die Expression der mRNA von TGF- $\beta$  (in *Abb.10* an TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 veranschaulicht), dem im Rahmen der chronischen Abstoßung über dessen vermehrte Transkription eine gewisse Bedeutung zugeschrieben wird (*s.1.4.2.1*), unter den nachweisbaren Spiegeln der syngenen Kontrollen. Die Transkription der untersuchten Zyto- und Chemokine ist in den meisten allogenen Transplantaten allerdings deutlich höher als in den syngenen Kontrollgruppen, oft lassen sich aber keine wesentlichen Unterschiede zwischen den CCR4-defizienten Mäusen und den Wildtyp-Mäusen ausmachen. Interessanterweise wurden im akuten Abstoßungsverhalten zwischen CCR4<sup>-/-</sup> und CCR4<sup>+/+</sup> Mäusen Unterschiede der mRNA-Spiegel nachgewiesen, die sich zu denen am Tag 30 sowie 60 (chronische Phase der Abstoßung) genau entgegengesetzt verhielten; dies ist am Beispiel von MIP-1 $\alpha$  zu sehen.

### 3.2.3 Konventionelle Histologie

In allen histologischen Schnitten ließ sich ein Thrombus innerhalb des linken Ventrikels nachweisen. Dieser resultierte aus der gewählten Operationsmethode (*s. 2.4.5.1*) und ist bedingt durch die Art der Gefäßanastomosen. So befand sich der nach fünf Tagen zellreiche Thrombus in den 30- bzw. 60-Tage-Präparaten bereits weitgehend in Organisation mit deutlichen Zeichen des fibrotischen Umbaus.

Gruppe	Therapie	Score Tag 5
Syngene Kontrolle	ohne Therapie	0, 0, 0
Allogen Kontrolle Akute Abst.	ohne Therapie	3b, 3b, 4, 4,
Allogen CCR4 <sup>-/-</sup> Akute Abst.	ohne Therapie	3b, 3b, 4
Allogen Kontrolle	Galliumnitrat	3a, 3a,3a
Allogen CCR4 <sup>-/-</sup>	Galliumnitrat	3a, 3a, 3a

**Tab.3:** Auswertung von akut abgestoßenen Herztransplantaten aus Wildtyp- (CCR4<sup>+/+</sup>) und CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen nach der Billingham-Klassifikation.

Die akut abgestoßenen Herzen wurden fünf Tage nach Transplantation unter anderem hinsichtlich der Billingham-Klassifikation untersucht. Es sei darauf hingewiesen, dass die Analyse ganzer Herzquerschnitte per definitionem keine Abstoßung Grad 2 nach Billingham zulässt (s. 2.6). In syngenem Kontrollherzen fanden sich unabhängig vom Entnahmepunkt keinerlei Zeichen einer Abstoßungsreaktion; dies entspricht Grad 0 der Billingham-Klassifikation. Fünf Tage nach Transplantation konnten in den unbehandelten Tieren sowohl bei den CCR4<sup>+/+</sup> als auch den CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen im entnommenen Spenderherzen diffuse Entzündungsprozesse mit ausgedehnten Myozytolysen und aggressivem perivaskulären sowie interstitiellen Zellinfiltrat nachgewiesen werden (Tab.3). Darüber hinaus fanden sich ödematös und hämorrhagisch imponierende Areale. Die morphologischen Veränderungen der mit Galliumnitrat behandelten Tiere (in therapeutischer Dosierung) waren demgegenüber weniger stark ausgeprägt. Es fehlten ausgedehnte Abstoßungszeichen bei höchstens fokalen Entzündungsprozessen mit vereinzelt Myozytolysen (Abb.11). Vor allem die perivaskulären Bereiche sowie die Tunica media der Gefäße selbst zeigten bei den medikamentös behandelten Tieren ein milderes zelluläres Infiltrat. Dieser Befund spricht für den effektiven Einsatz von GN als Immunsuppressivum.

Gruppe	Infiltrat	Ödem	Nekrose	Fibrose	Verkalkung	Endokardbeteiligung
Kontrolle nativ	0	0	0	0	0	0
70d syngen Kontrolle	0	0	0	0	0	0
5d allogene Kontrolle	++/++	+/+++	+	0	0	+
5d allogene Kontr. GN	+/+++	+/+++	+	0	0	+
5d allogene CCR4 <sup>-/-</sup>	+/+++	+/+++	++	0	0	+
5d allogene CCR4 <sup>-/-</sup> GN	+/+++	+	+/+++	0	0	+
30d allogene Kontrolle	-/+	-	0	-	+	+
30d allogene CCR4 <sup>-/-</sup>	-	-	0	-	+	+
60d allogene Kontrolle	+/-	0	0	+	++	+
60d allogene CCR4 <sup>-/-</sup>	-	-	0	+	++	+

**Tab.4:** Übersicht der einzelnen pathologischen Kriterien im Myokard der jeweiligen Gruppen; am HE-Präparat bewertet;

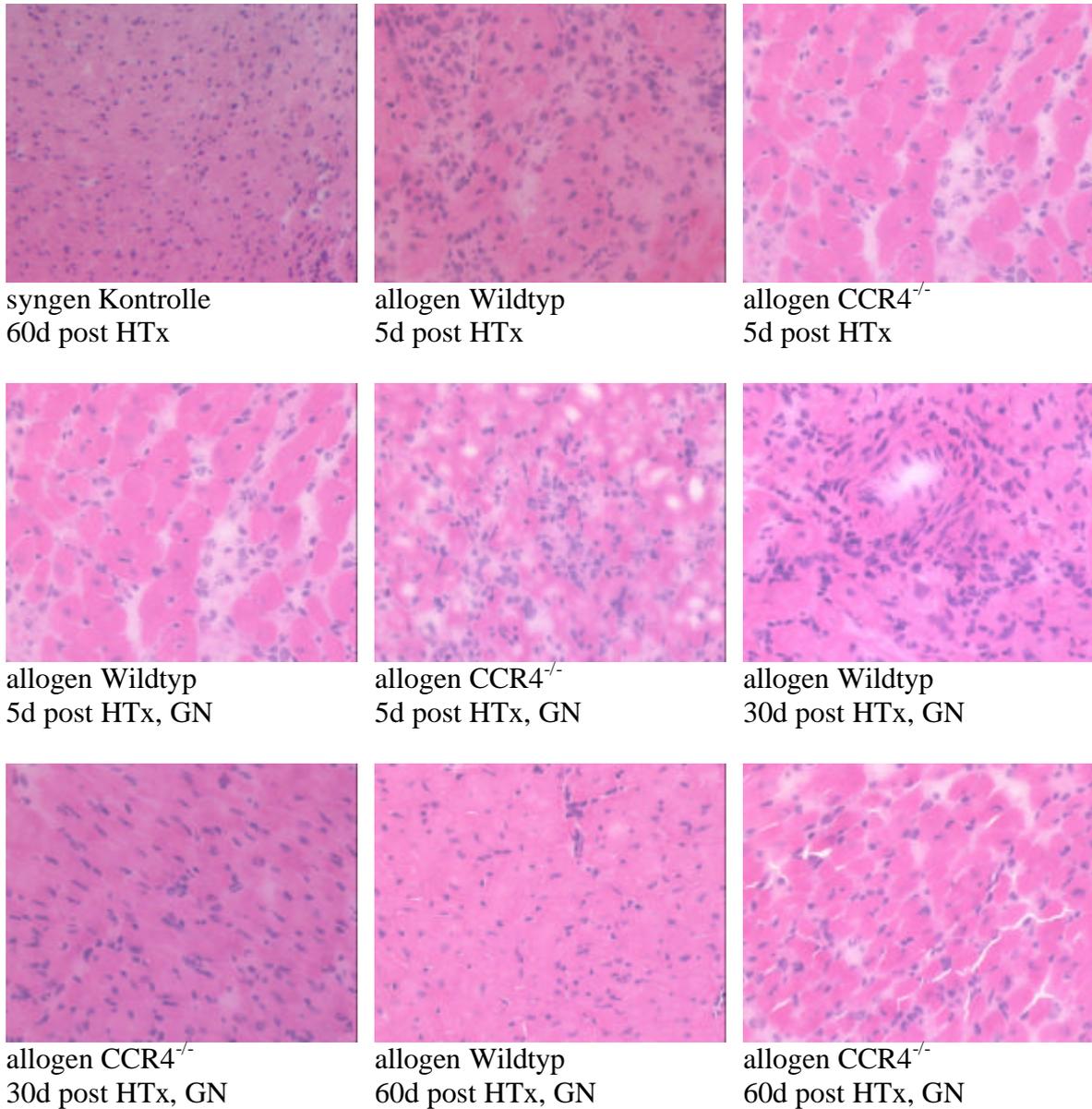
30 bzw. 60 Tage nach Transplantation zeigten sich in syngenen Herzen keine Veränderungen im Sinne nekrotischer bzw. fibrosierender Gewebsareale. Auch bei Betrachtung speziell der perivaskulären Regionen konnten keine Zellinfiltrationen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren bei den GN-behandelten allogenen Gruppen 30 Tage nach Transplantation mäßige perivaskuläre sowie interstitielle Zellinfiltrationen festgestellt worden. Diese blieben bis einschließlich Tag 60 post transplantationem weitgehend unverändert. Zudem wiesen die chronisch abgestoßenen Herzen deutliche Verkalkungen auf (Abb.11, Tab.4 und 5).

Gruppe	Neointima	Perivask. Infiltrat	Media Infiltrat	Perivask. Fibrose	Perivask. Ödem
Kontrolle nativ	0	0	0	0	0
70d syngen Kontrolle	0	0	0	0	0
5d allogen Kontrolle	0	+ / + +	+ / + +	0	+
5d allogen Kontr. GN	0	+ / -	+ / -	0	+
5d allogen CCR4 <sup>-/-</sup>	0	+	-	0	++
5d allogen CCR4 <sup>-/-</sup> GN	0	-	-	0	+
30d allogen Kontrolle	+ / -	+ / -	+	+ / -	-
30d allogen CCR4 <sup>-/-</sup>	+ / -	+	+	+ / -	-
60d allogen Kontrolle	++	+	+	+	-
60d allogen CCR4 <sup>-/-</sup>	+ / -	++	+	+	-

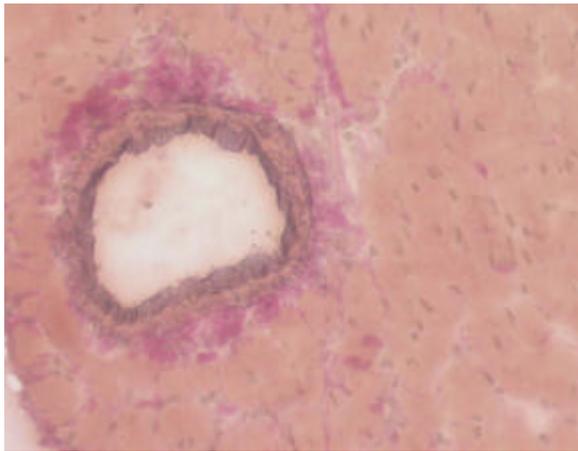
**Tab.5:** Übersicht der einzelnen pathologischen Kriterien im Gefäßbereich der jeweiligen Gruppen; am HE-Präparat sowie in der Elastica-Färbung untersucht;

Die in der akuten Phase der Abstoßung ausgeprägten ödematösen Bereiche waren 30 bis 60 Tage nach Transplantation nicht mehr aufzufinden. In der Elastica van Gieson Färbung waren nach 60 Tagen sowohl bei den allogenen Kontroll- als auch den CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen deutliche Zeichen der fibrotischen Gewesumwandlung zu sehen. Zusätzlich ließ sich eine mäßig bis ausgeprägte Intimahyperplasie als Ausdruck der chronischen Transplantatvaskulopathie erkennen. Bei sonst weitgehend ähnlichem morphologischen Erscheinungsbild schien diese neointimale Proliferation in den CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen etwas geringer ausgeprägt zu

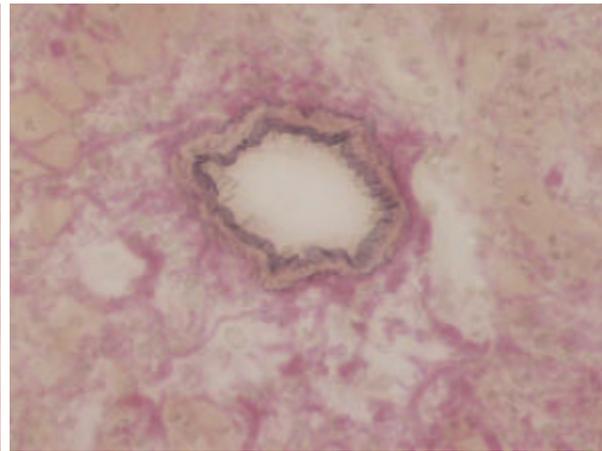
sein (Abb.12), was als Zeichen einer nur moderaten chronischen Abstoßungsreaktion gewertet werden könnte.



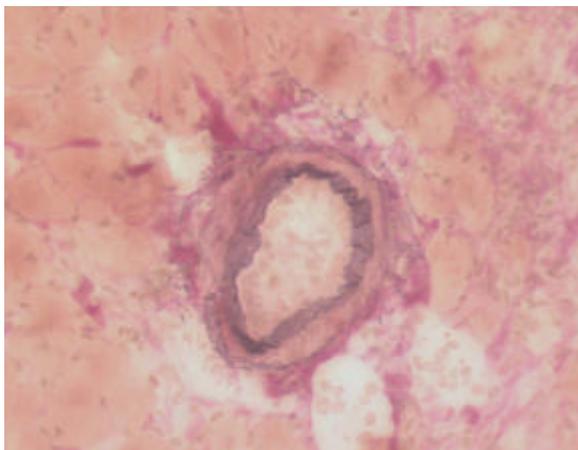
**Abb.11:** Übersicht über die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Herzen  
Exemplarisch sind HE gefärbte Herzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation dargestellt.  
Nach Transplantation der vollallogenen Spenderherzen (BALB/c - C57BL/6 CCR4<sup>+/+</sup> sowie CCR4<sup>-/-</sup>) wurden die Empfängertiere entweder mit Galliumnitrat (GN) therapiert oder sie blieben unbehandelt.  
Alle Abbildungen sind in 20-facher Vergrößerung dargestellt.



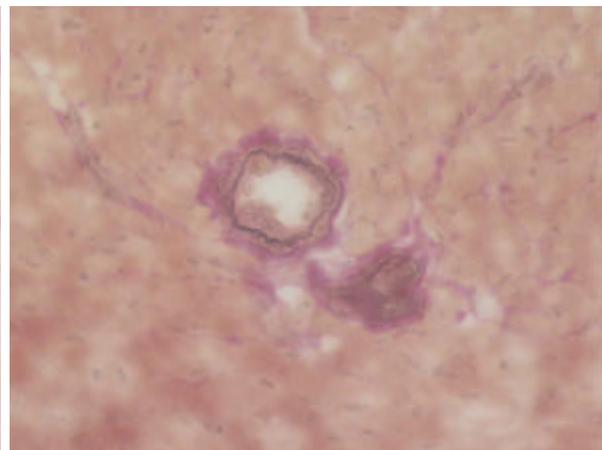
allogen Wildtyp  
30d post HTx, GN



allogen CCR4<sup>-/-</sup>  
30d post HTx, GN



allogen Wildtyp  
60d post HTx, GN



allogen CCR4<sup>-/-</sup>  
60d post HTx, GN

**Abb.12:** Übersicht über die in der Elastica van Gieson gefärbten Herzen  
Exemplarisch sind Herzen in der Elastica-Färbung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation dargestellt. Nach Transplantation der vollallogenen Spenderherzen (BALB/c - C57BL/6 CCR4<sup>+/+</sup> sowie CCR4<sup>-/-</sup>) wurden die Empfängertiere entweder mit Galliumnitrat (GN) therapiert oder sie blieben unbehandelt. Alle Abbildungen sind in 20-facher Vergrößerung dargestellt.

### 3.2.4 Immunhistochemie

Zur Untersuchung des zellulären Infiltrates wurden Kryoschnitte mit monoklonalen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD4, CD8, CD11b (Mac-1) und B220 gefärbt. Syngene Herzen zeigten zu keinem Zeitpunkt infiltrierende CD4- und CD8-T-Lymphozyten (CD4- bzw. CD8-Färbung), Makrophagen, Granulozyten oder NK-Zellen (CD11b<sup>+</sup>- bzw. Gr-1<sup>+</sup>-Zellen; Gr-1<sup>+</sup>-Färbung, spezifisch für Granulozyten, nicht dargestellt). Die Transplantate ohne zusätzliche Immunsuppression wiesen unabhängig vom CCR4-Defekt

bereits fünf Tage nach der Transplantation ein deutliches Infiltrat CD4-, CD8- und CD11b- (Mac-1) positiver Zellen auf. In der Gegenfärbung mit Gr-1 (nur vereinzelt Zellen nachgewiesen) konnten die CD11b<sup>+</sup>-Zellen vor allem als Makrophagen bzw. NK-Zellen verifiziert werden. Diese Befunde verdeutlichen, dass das histologische Korrelat einer akuten Abstoßungsreaktion ein Infiltrat vorwiegend von T-Lymphozyten, Makrophagen und/oder NK-Zellen ist, denn auch in der B220-Färbung (spezifische B-Zell-Färbung, nicht dargestellt) ließen sich nur vereinzelt infiltrierende Zellen zur Darstellung bringen. Alle Untersuchungen der infiltrierenden Zellen bezogen sich auf perivaskuläre Regionen und das Interstitium (Tab.6 und 7) und schlossen Infiltrate im Bereich des Epikards bzw. angrenzend an das Ventrikellumen aus. Perivaskulär fanden sich vor allem CD4 und CD11b positive Zellen, im Myokard zeigten sich überwiegend CD11b<sup>+</sup> Zellen.

Gruppe	Mac-1 / (%)	Gr-1/ (%)	CD4 / (%)	CD8 / (%)	CD4/8-Ratio
Kontrolle nativ	0	0	0	0	-
70d syngen Kontrolle	0	0	0	0	-
5d allogene Kontrolle	20 (21)	71 (74)	2,16 (2,5)	2,3 (2,5)	1
5d allogene Kontr.GN	69 (52)	60 (44,5)	0,75 (0,5)	2,7 (2,0)	0,25
5d allogene CCR4 <sup>-/-</sup>	27 (22)	92 (75)	0,12 (0,1)	3,7 (2)	0,07
5d allogene CCR4 <sup>-/-</sup> GN	29 (22)	103 (77)	0,33 (0,2)	0,52 (0,4)	0,7
30d allogene Kontrolle	4 (14)	22 (77)	2,4 (4,5)	0,33 (4,5)	1
30d allogene CCR4 <sup>-/-</sup>	72 (78)	2,27 (2,7)	0,63 (0,4)	16,8 (16,8)	0,03
60d allogene Kontrolle	20 (57)	4,5 (13,5)	2,7 (8)	7,3 (21,5)	0,4
60d allogene CCR4 <sup>-/-</sup>	43 (42)	45 (45)	3,25 (3)	10,5 (10)	0,3

**Tab.6:** Zelluläres Infiltrat des Myokards bei 40-facher Vergrößerung; Grundlage der Zahlenwerte war die Auszählung von jeweils vier Gesichtsfeldern eines Herzschnittes. Untersucht wurden drei Herzschnitte pro Herz bei mindestens drei Herzen pro Gruppe; die jeweilige prozentuale Verteilung ist in Klammern angefügt; das CD4/8-Verhältnis ist als CD4/8-Ratio angegeben.

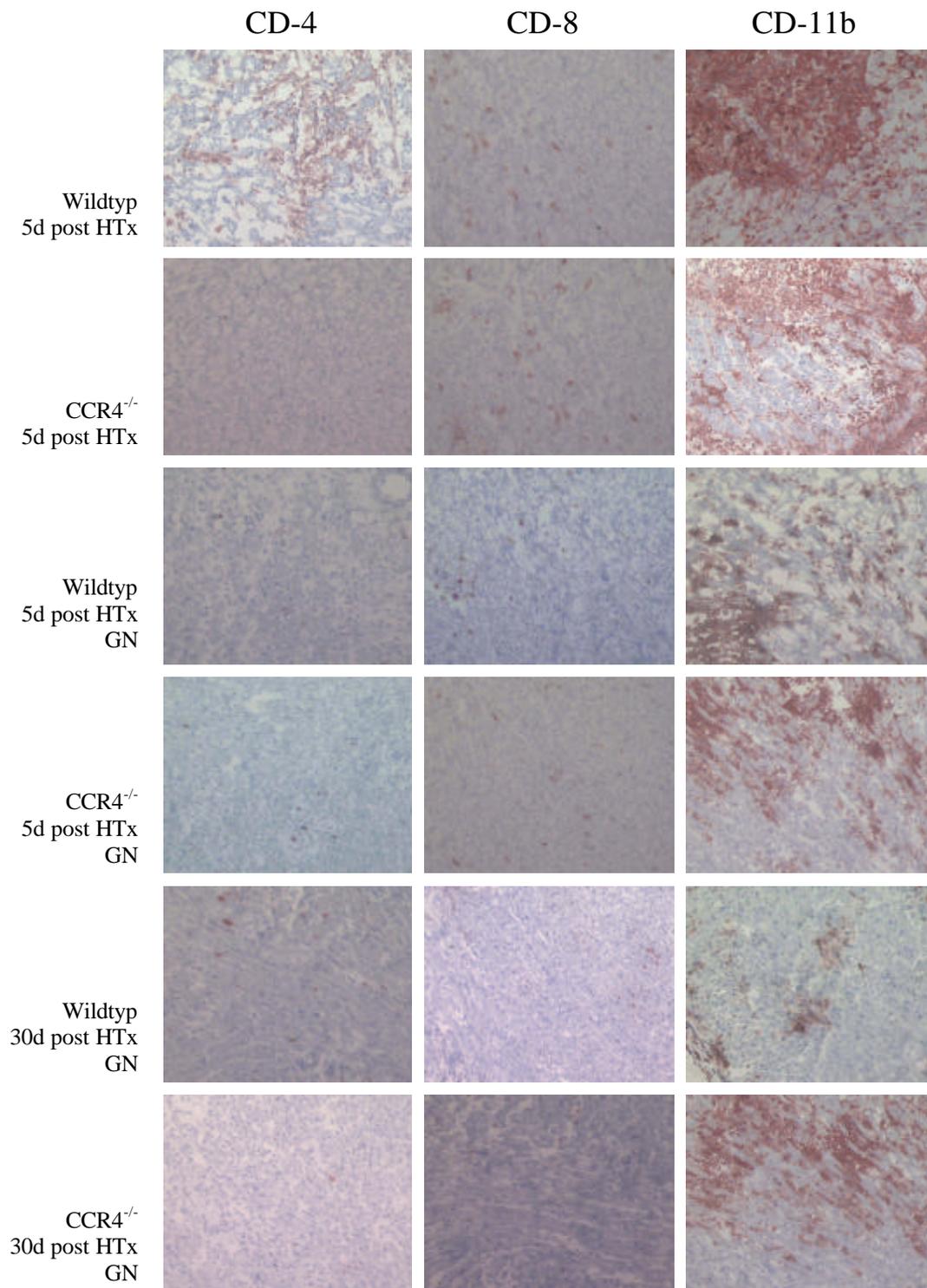
Die histologischen Schnitte der nach fünf Tagen explantierten und mit GN therapierten Herzen wiesen deutlich reduzierte Infiltrate aller Entzündungszellen auf. Dies spricht – neben der bereits in vivo gezeigten Verlängerung des Transplantatüberlebens bei GN-Applikation – für den effektiven Einsatz von GN im verwendeten Modell. CCR4-defiziente

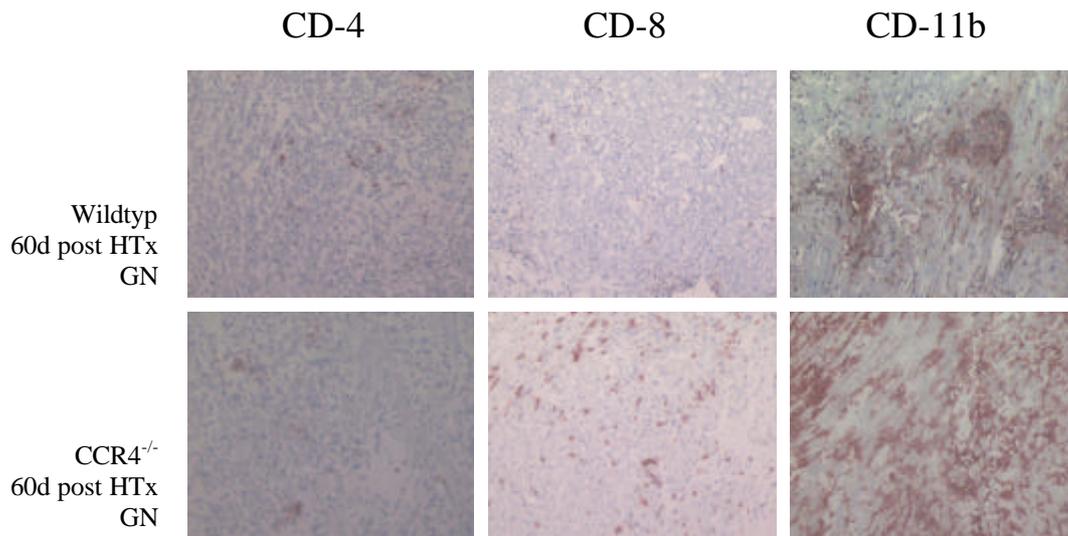
Mäuse zeigten in der quantitativen Analyse im Vergleich zum Wildtyp eine vor allem perivaskulär leicht geringere Infiltration der genannten Zellpopulationen.

Gruppe	Mac / (%)	Gr-1 / (%)	CD4 / (%)	CD8 / (%)	CD4/8-Ratio
Kontrolle Nativ	0	0	0	0	-
70d syngen Kontrolle	0	0	0	0	-
5d allogene Kontrolle	3 (11)	18 (66)	2,5 (9)	3,8 (14)	0,64
5d allogene Kontr.GN	2,2 (17)	9,8 (75,7)	0,6 (4,6)	0,35 (2,7)	1,7
5d allogene CCR4 <sup>-/-</sup>	0,7 (10,3)	4,5 (66,2)	0,1 (1,5)	1,5 (22)	0,07
5d allogene CCR4 <sup>-/-</sup> GN	0,3 (20,6)	0,7 (48,3)	0,2 (13,8)	0,25 (17,3)	0,78
30d allogene Kontrolle	3,4 (66,7)	1,0 (19,6)	0,7 (13,7)	0 (0)	-
30d allogene CCR4 <sup>-/-</sup>	4,2 (31,8)	0,5 (3,8)	0 (0)	8,5 (64,4)	-
60d allogene Kontrolle	1,2 (17,4)	0,4 (5,8)	1,2 (17,4)	4,1 (59,4)	0,23
60d allogene CCR4 <sup>-/-</sup>	6,3 (67,4)	1,2 (12,8)	0,55 (5,9)	1,3 (13,9)	0,42

**Tab.7:** Zelluläres Infiltrat perivaskulär bei 40-facher Vergrößerung; Grundlage der Zahlenwerte war die Auszählung von jeweils vier Gesichtsfeldern eines Herzschnittes. Untersucht wurden drei Herzschnitte pro Herz bei mindestens drei Herzen pro Gruppe; die jeweilige prozentuale Verteilung ist in Klammern angefügt; das CD4/8-Verhältnis ist als CD4/8-Ratio angegeben.

Die interstitiellen und perivaskulären Infiltrate der Langzeit-Allotransplantate (30 bzw. 60 Tage nach Transplantation) bestanden aus CD4- bzw. CD8-positiven T-Zellen, eingewanderte CD11b<sup>+</sup> Zellen dominierten jedoch das Erscheinungsbild. CCR4-defiziente Empfängertiere zeigten im Vergleich zum Wildtyp entweder gleiche oder geringere Anzahlen eingewanderter CD4-Zellen. Interessanterweise wiesen die knock out Mäuse jedoch verhältnismäßig mehr infiltrierende CD8-Zellen auf. Genauso waren in den CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den CCR4<sup>+/+</sup> Mäusen verhältnismäßig mehr CD11b<sup>+</sup> Zellen im Myokard bzw. perivaskulär nachweisbar. B-Zellen konnten auch im Langzeitmodell wiederum nur vereinzelt angefärbt werden (Abb.13).





**Abb.13:** Immunhistochemische Färbungen der zu verschiedenen Zeitpunkten nach HTx entnommenen Herztransplantate. Die erste Spalte zeigt eine CD4-Färbung mit entsprechender Anfärbung CD4-positiver T-Lymphozyten. CD8-positive T-Zellen werden in der zweiten Spalte mit einer CD8-Färbung dargestellt. In der dritten Spalte werden die Präparate mit dem Oberflächenmarker CD11b (Mac-1) gefärbt; dieser ist spezifisch für Makrophagen, Granulozyten sowie NK-Zellen. Vergrößerung  $\times 80$ .

## 4 Diskussion

Die vorliegende Dissertation beschäftigte sich mit dem Einfluss des Chemokinrezeptors 4 auf die akute bzw. chronische Transplantatabstoßung. Die Untersuchungen wurden an heterotop transplantierten Herzen in CCR4-defizienten Mäusen vorgenommen. Dabei war es Ziel dieser Arbeit, die Rolle des Oberflächenrezeptors CCR4 bei der akuten als auch chronischen Transplantatabstoßung im Mausmodell zu charakterisieren. Durch ein besseres Verständnis der immunologischen Vorgänge in vivo sollten wertvolle Informationen gewonnen werden, um einen effektiven Einsatz neuer medikamentöser Therapieschemata gegen den Transplantatverlust zu entwickeln.

In der Anfangsphase einer gegen ein Transplantat gerichteten immunologischen Abstoßungsreaktion spielt die Tatsache eine wichtige Rolle, dass das transplantierte Spendergewebe als fremd erkannt wird und – über Aktivierung von T-Lymphozyten durch Interaktion des zelleigenen TCR mit MHC-assoziierten Antigenstrukturen des Spenders – geschädigt wird <sup>71; 163</sup>. Auch im Rahmen des chronischen Transplantatversagens, das charakterisiert ist durch einen progressiven Rückgang der Transplantatfunktion Wochen bis Monate nach Transplantation, werden neben nichtimmunologischen Einflüssen vor allem immunologische Reaktionen gegen das Spendergewebe angenommen. Fest steht, dass es sich beim chronischen Transplantatversagen um einen multifaktoriellen Prozess handelt, der durch eine persistierende vaskuläre und perivaskuläre Entzündungsreaktion sowie die Entstehung einer Arteriosklerose im Sinne einer Transplantatvaskulopathie charakterisiert ist. So kommt es durch diese chronischen immunologischen Reaktionen mit konsekutiver Schädigung des Gefäßendothels zur Sekretion bestimmter Wachstumsfaktoren, die neben der Induktion verschiedener Molekülkaskaden entscheidend zur Pathogenese des chronischen Transplantatversagens beitragen <sup>115</sup>. In beiden Fällen – sowohl in der akuten Abstoßungsphase als auch beim chronischen Transplantatversagen – muss jedoch eine direkte Interaktion von fremder Spenderzelle und körpereigenen Effektor-T-Lymphozyten gewährleistet sein, um eine entsprechende Abstoßungsreaktion zu bewirken. Genau in diesem Reaktionsschritt scheint den Chemokinen eine große Rolle zuzukommen. Sie steuern unter anderem die Leukozyteninteraktionen mit vaskulärem Endothel im Rahmen der Lymphozytenwanderung; so vermitteln sie wichtige Schritte des sog. Leukozyten-„rollings“ und

der anschließenden festen Anhaftung der Leukozyten am Endothel, worauf deren transendotheliale Wanderung an Orte bestimmter Entzündungsreaktionen folgt. Aber auch die Rekrutierung unreifer Blutzellen und naiver Lymphozyten in primäre und sekundäre lymphatische Organe ist Aufgabe der chemotaktisch wirkenden Zytokine. Der Chemokinrezeptor 4 ist ein Oberflächenmolekül, das nach einigen Studien selektiv auf Th2-Zellen exprimiert wird<sup>22; 98; 165</sup>, in anderen Untersuchungen wird von der Expressierung auch auf Monozyten bzw. Makrophagen<sup>156</sup>, Blutplättchen<sup>155</sup>, basophilen Granulozyten<sup>156</sup>, NK-Zellen<sup>99</sup> und NKT-Zellen<sup>107; 113</sup> ausgegangen. Es ist beschrieben, dass der CCR4/MDC-Pathway primär verantwortlich ist für die Langzeitrekrutierung AG-spezifischer Th2-Zellen in die entsprechenden Zielorgane während chronisch entzündlicher Antworten, in denen ein permanenter AG-Kontakt aufrechterhalten wird<sup>118</sup>. Für TARC – ebenfalls einen spezifischen Liganden des CCR4-Rezeptors – konnte die Expression in aktiviertem Endothel (v.a. im Bereich der Haut) nachgewiesen werden<sup>34</sup>. Somit könnte auch TARC durch Vermittlung der Interaktion von Leukozyten bzw. Makrophagen und Endothelzellen an der Positionierung dieser Zellen in derartige Entzündungsgebiete beteiligt sein. Dies würde bedeuten, dass allogene Herztransplantate von Mausempfängern ohne Möglichkeit der Stimulierung des CCR4/MDC- bzw. TARC-Pathways vor allem im Rahmen des späten Transplantatversagens – das ja ebenfalls ein chronisches Entzündungsgeschehen darstellt – ein moduliertes Abstoßungsverhalten und möglicherweise verlängertes Transplantatüberleben aufweisen.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich des Transplantatüberlebens allogener Herztransplantate in der CCR4<sup>-/-</sup> Maus zeigten, dass das alleinige Fehlen des CCR4-Rezeptors im Rahmen der akuten Abstoßung nicht zu einer statistisch signifikanten Verlängerung der Herzaktion führte. Dies könnte folgende Gründe haben: Unreife dendritische Zellen (DZ) nehmen in der Peripherie Antigene auf und differenzieren sich nach Wanderung in lymphatische Organe in reife DZ. Sie sind nun befähigt, naive T-Zellen in bestimmten T-Zell-Regionen dieser sekundären lymphatischen Organe zu aktivieren. Dies geschieht über die Präsentation der prozessierten antigenen Determinanten in Assoziation körpereigener MHC-Moleküle. Stimulierte T-Zellen differenzieren sich dann in Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen, die – basierend auf ihrer unterschiedlichen Zytokinproduktion – in Th1 und Th2 Untergruppen unterteilt werden. Die Differenzierung in den einen oder anderen Zelltyp scheint unter anderem von gewissen Kostimulatoren sowie von Zytokinen, die während der T-Zell-Aktivierung gebildet werden, abzuhängen<sup>98</sup>. Anschließend wandern die Ge-

dächtnis- und Effektor-T-Zellen in die Peripherie und führen - nach erneutem AG-Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen im Gewebe – ihre Effektorfunktionen über die Produktion von Th1/Th2-Zytokinen aus. Es wird vermutet, dass eine akute Abstoßung durch Th1-Zellen initiiert wird, die sowohl zytotoxische T-Zellen aktivieren als auch eine DTH-Antwort fördern<sup>72</sup>. Sie zeichnen sich vor allem durch die Expression der Rezeptormoleküle CCR5 und CXCR3 aus. Das Rezeptormuster auf den T-Zellen scheint dabei charakteristisch zu sein für den Zustand ihrer Aktivierung bzw. Differenzierung; sie können daher selektiv rekrutiert werden und spezifische Aufgaben erfüllen. Tatsächlich konnte in verschiedenen Untersuchungen für das Fehlen der Rezeptoren CCR5 und CXCR3 ein Überlebensvorteil im Rahmen der akuten Abstoßung beobachtet werden<sup>60; 78</sup>. In den im Rahmen dieser Arbeit operierten Gruppen sah man nach Explantation und histologischer Aufarbeitung der Transplantate, dass am fünften postoperativen Tag ein diffuses aggressives Infiltrat mit T-Lymphozyten, Makrophagen bzw. NK-Zellen und vereinzelt Granulozyten in Erscheinung trat sowie Zeichen höhergradiger Abstoßung nach der Billingham-Klassifikation festzustellen waren. Trotz Fehlen des Oberflächenrezeptors CCR4 waren also zahlreiche Entzündungszellen aktiviert und im Transplantat nachweisbar. Eine differenzierte Aufschlüsselung der im Transplantat vorgefundenen T-Lymphozyten in Th1- bzw. Th2-Untergruppen war mit dieser Färbemethode jedoch nicht möglich. Die Daten der Überlebenszeiten akut abgestoßener Herztransplantate in CCR4-defizienten Mäusen sowie deren immunhistologische und konventionell histologische Untersuchungen bestätigten, dass entweder tatsächlich die Th1-Zellen bzw. andere CCR4-negative Zelltypen entscheidend für den Prozess der akuten Abstoßung verantwortlich sind, oder aber dass der mögliche Einfluss dieses Rezeptormoleküls im Rahmen der akuten Abstoßung leicht über andere Zelloberflächenstrukturen bzw. Zell-Zell-Interaktionen ausgeglichen werden kann.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass der Rezeptor CCR4 vor allem in der chronischen Phase der Abstoßung von Bedeutung ist. Für das Erlangen des chronischen Transplantatverlustes im Mausmodell war es notwendig, den Empfängertieren eine immunsuppressive Behandlung zukommen zu lassen. Als geeignetes Therapieschema stellte sich die subkutane Applikation von Galliumnitrat (GN) in die Nackenpartie der Mäuse heraus. Unter GN-Applikation war eine Verhinderung der akuten Abstoßungsphase bei gleichzeitigem Auftreten charakteristischer Zeichen chronisch abgestoßener Herzen wie interstitieller Fibrose oder Intimahyperplasie möglich. Bei heterotop transplantierten DBA/2-Herzen auf C57BL/6-Empfängertiere war diesbezüglich die Gabe von 30 mg/kg

KG am Tag der Operation sowie dritten postoperativen Tag und anschließender Verabreichung von 10 mg/kg KG jeden weiteren dritten Tag bis Tag 30 ausreichend<sup>140</sup>. In unserem Modell mit vollallogenen BALB/c-Mäusen als Spendern und C57BL/6-Mäusen als Empfängertieren erwies sich die verabreichte Dosis als nicht hoch genug. Dennoch wurden in entsprechend durchgeführten Versuchsgruppen die Herzen sowohl bei allogenen Wildtyp- als auch den CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen zeitlich versetzt – wenn auch meistens deutlich vor dem 60. postoperativen Tag – abgestoßen. Durch eine veränderte Therapie mit einer Applikation von 30 mg GN/kg KG am Operationstag, ersten bis dritten postoperativen sowie der Gabe von 30 mg GN/kg KG jeden weiteren zweiten Tag bis einschließlich Tag 30 konnte ein Langzeitüberleben der transplantierten Herzen erreicht werden. Möglicherweise ist die Herannahme der vollallogenen BALB/c-Herzen als Spenderorgane für die notwendige Dosissteigerung in unserem Modell verantwortlich zu machen. *Orosz et al.* beschreiben hinsichtlich des täglichen Palpationsbefundes der transplantierten Herzen eine in einigen Fällen aufgetretene Abnahme der Kontraktionskraft zwischen dem achten und 15. postoperativen Tag und eine Rückführung zur ursprünglichen Kontraktionskraft am 23. bis einschließlich 60. postoperativen Tag. Da der Rückgang des Impulses zu einem Zeitpunkt stattfand, an dem allogene Herztransplantate abgestoßen werden (ohne Therapie ca. 10-14 Tage post OP bei Transplantation von DBA/2-Herzen in C57BL/6 Mäuse) vermutet diese Gruppe, dass es sich um eine weniger stark entwickelte, vorübergehende Phase der akuten Abstoßung handeln könnte<sup>139</sup>. Ein derartiges Verlaufsmuster konnte in unseren Experimenten in keinem einzigen Fall nachvollzogen werden. Die Herzen wurden ebenfalls durch tägliche Palpation auf ihre Funktionstüchtigkeit hin untersucht. Eine einmal aufgetretene Abnahme der Kontraktionskraft (Impulsstärke +++ bis 0+, *Daten nicht gezeigt*) führte im Fortlauf stetig zu einem weiteren Rückgang der Impulsstärke bis hin zum vollständigen Sistieren der Herzaktion. Dies könnte ebenfalls auf den vollallogenen Charakter der Spenderherzen bezüglich der Empfängertiere in allen Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigenen zurückzuführen sein. Der genaue Wirkungsmechanismus von Galliumnitrat ist noch nicht vollständig verstanden. In Studien zeigte sich, dass GN die humanen allogenen T-Zell-Antworten *in vitro* hemmt<sup>94</sup>. Dennoch konnten in immunologischen Studien unter Verwendung von GN entzündliche Reaktionen, unter anderem auch die Infiltration von T-Zellen bzw. eine kontinuierliche Antikörperproduktion, nachgewiesen werden<sup>139</sup>. Die histologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützten diese Befunde. Denn in mit GN behandelten Mäusen waren sowohl fünf Tage nach Transplantation als auch zu

späteren Zeitpunkten CD4- bzw. CD8-positive T-Lymphozyten im entzündlichen Infiltrat vorhanden.

In der chronischen Transplantatabstoßung scheinen, wie bereits erwähnt, Th2-Lymphozyten eine große Rolle zu spielen. *Hancock et al.* betonen den Zusammenhang Th2 bedingter Immunantworten mit der Entwicklung einer chronischen Transplantatabstoßung und entsprechenden Atherosklerose <sup>79</sup>. Außerdem deuten verschiedene Untersuchungen auf die Expression von CCR4 vor allem auf den IL-4 und IL-5 sezernierenden Th2 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen hin <sup>22; 49; 118; 165</sup>. Dies könnte erklären, dass CCR4<sup>+</sup> Th2-Zellen entscheidend am Prozess des chronischen Transplantatversagens beteiligt sind. Der Oberflächenrezeptor CCR4 wäre daher einer Gruppe von Rezeptoren bestehend aus CCR1, CCR3 und CX<sub>3</sub>CR zuzuordnen, die ebenfalls Einfluss auf das chronische Transplantatversagen nehmen <sup>61; 74; 76; 82</sup>. Gleichzeitig konnte für IFN- $\gamma$ -produzierende Th1-Zellen gezeigt werden, dass sie nicht essentiell in die Pathogenese der späten Transplantatabstoßung einbezogen sind <sup>149</sup>. Die im Rahmen dieser Arbeit durch das RNase Protektion Assay gewonnenen Ergebnisse zeigten bezüglich der Expression von IFN- $\gamma$  in der akuten Phase der Abstoßung deutlich über der syngenen Kontrolle liegende Werte, wohingegen die Transkription des Zytokins in 30 oder gar 60 Tage alten Transplantaten stark reduziert war. In anderen Studien wird dagegen die Expression von IFN- $\gamma$  in allogenen Langzeittransplantaten beschrieben <sup>140</sup>. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass auch IFN- $\gamma$ -produzierende Th1-Zellen in die chronische Phase der Transplantatabstoßung einbezogen sind. Obwohl der Einfluss von IFN- $\gamma$  im Rahmen der chronischen Abstoßung noch nicht bekannt ist, könnte es in die Stimulation der chronischen Immunantwort involviert sein, indem es die verstärkte Expression von Klasse-I- und -II-Molekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen (EZ) und glatten Muskelzellen im transplantierten Organ reguliert <sup>171</sup>. Interessant scheint in diesem Zusammenhang, dass IFN- $\gamma$  die Synthese von TGF- $\beta$  in aktivierten Makrophagen bedingt, die das zelluläre Infiltrat chronisch abgestoßener Transplantate bestimmen. TGF- $\beta$  wird stark in chronisch abgestoßenen Herzen exprimiert <sup>172</sup> und kann wiederum Makrophagen und NK-Zellen über einen autokrinen Weg zur Synthese von IL-10 bringen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten des Protektion Assay zeigten jedoch bei TGF- $\beta$  sowohl im akuten als auch im Langzeitmodell keine signifikante Steigerung der Transkription über das Niveau der syngenen Transplantate hinaus.

IL-10 wird neben Th2-Zellen auch von Makrophagen sezerniert, und es konnte gezeigt werden, dass es spezifisch inflammatorische Antworten, die über Th1-Zellen vermittelt werden, durch verschiedene molekulare Mechanismen hemmen kann<sup>133</sup>. Neben IL-10 wird in allogenen Langzeittransplantaten mit IL-4 ein weiteres Th2-spezifisches Zytokin hoch exprimiert. Diese Ergebnisse verdeutlichen neben einer Reihe weiterer Studien<sup>38; 77; 138; 168; 172; 186</sup> die vornehmliche Th2-Zytokin-Produktion und Anwesenheit von CD4-Th2-Lymphozyten in chronisch abgestoßenen Organen. Sie greift neben der Regulierung der allo-AK-Sekretion durch B-Zellen auch in den Prozess der Aktivierung und Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen und deren Wanderung in die Intima ein. Demgegenüber zeigen andere Untersuchungen die Expression von CCR4 auch auf in die Haut einwandernden Th1 Gedächtniszellen<sup>34</sup> sowie Monozyten<sup>156</sup>, Blutplättchen<sup>155</sup>, NK-<sup>99</sup> und NKT-Zellen<sup>107</sup>. Die Abwesenheit des CCR4-Rezeptors auf diesen Zellen würde nun zur fehlenden Interaktion dieses Oberflächenmoleküls mit seinen beiden Liganden TARC und MDC führen, die – wie an anderer Stelle bereits erwähnt – im Rahmen verschiedener Entzündungsgeschehen von Makrophagen und DZ sezerniert werden. Wäre dieser CCR4/MDC- bzw. TARC-Pathway im peripheren Gewebe im Hinblick auf die chronische Rekrutierung von T- bzw. CCR4-positiven NK-/NKT-Zellen oder Makrophagen von entscheidender Bedeutung, so müsste sich bei den heterotop transplantierten Spenderherzen in der CCR4-defizienten knock out Maus ein verlängertes Transplantatüberleben einstellen.

Tatsächlich konnte mittels der reversen Transkriptase PCR eindeutig die Expression von MDC und TARC in den heterotop transplantierten Herzen nachgewiesen werden. Unabhängig vom Zeitpunkt der Organentnahme wiesen alle untersuchten allogenen Transplantate eine deutliche Expression der mRNA beider Chemokine auf, die Werte der syngen transplantierten Herzen lagen ebenfalls deutlich über dem Niveau der nativen Herzen. Das zeigt, dass MDC und TARC - dieses scheint auf die Rekrutierung zirkulierender Gedächtnis-T-Zellen in die Haut entscheidenden Einfluss auszuüben<sup>34</sup> - auch das immunologische Geschehen im Rahmen der Transplantation beeinflussen können. Denn beide Chemokine müssen nach quantitativer Analyse der exprimierten mRNA in den transplantierten Herzen im Vergleich zu nativen Herzen als hochreguliert bewertet werden.

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen verdeutlichen den Einfluss des CCR4 Rezeptors auf das chronische Transplantatversagen. Einhundert Tage nach Transplantation war bei den CCR4<sup>+/+</sup> Mäusen nur noch in 28,1% der Fälle eine verifizierbare Herzaktion

festzustellen, bei den CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen ließ sich dagegen in 73,9% eine Herzkontraktion nachweisen. Um einen möglichen Background-Effekt der CCR4<sup>-/-</sup> Mäuse für das Phänomen des unterschiedlichen Abstoßungsverhaltens auszuschließen, wurden heterozygote CCR4<sup>+/-</sup> Mäuse ebenfalls einer heterotopen Herztransplantation unterzogen. Es zeigte sich, dass ihr Abstoßungsverhalten dem der allogenen Kontrollmäuse entsprach. In den CCR4<sup>-/-</sup> Gruppen ließ sich im Vergleich zu CCR4<sup>+/+</sup> Mäusen bei immunhistochemischer Aufarbeitung der Herzen eine verstärkte Infiltration CD8 positiver T-Zellen feststellen. Außerdem konnten in durchflusszytometrischen Analysen verhältnismäßig geringere Mengen eingewanderter NKT-Zellen beobachtet werden (bislang unveröffentlichte Daten; durchgeführt von Christine Tertilt / TU München). NK-Zellen schienen davon nicht betroffen zu sein. Interessanterweise zeigt CCR1, das an der Rekrutierung von Makrophagen in Allogtransplantate beteiligt ist<sup>61</sup>, nur einen geringen Effekt auf das Transplantatüberleben. Dagegen konnte für den Rezeptor CXCR3, der auf aktivierten NK-Zellen sowie T-Zellen exprimiert wird und die Migration dieser Zelltypen beeinflusst, ein deutlicher Einfluss auf das Überleben allogener Transplantate nachgewiesen werden<sup>75; 78; 129</sup>. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von *Maier et al.* überein, der an CD28-defizienten Mäusen unter Depletion NK1.1 positiver Zellen ein signifikant verlängertes Transplantatüberleben feststellen konnte<sup>124</sup>.

Bei den NKT-Zellen handelt es sich um Lymphozyten, denen Eigenschaften einerseits mit NK-Zellen, andererseits mit T-Zellen gemein sind<sup>123</sup> und die zur Produktion verschiedener Zytokine, darunter IFN- $\gamma$  und IL-4, befähigt sind<sup>105; 204</sup>. In der Maus wird dieser Zelltyp in der Regel durch die Expression sowohl von  $\alpha\beta$ TCR als auch von NK1.1 definiert. Verschiedene Studien schreiben den NKT-Zellen eine gewisse Rolle an der Th1/Th2-Differenzierung zu<sup>29; 45; 70; 205</sup>. Als klassische NKT-Zellen werden die V $\alpha$ 14-NKT-Zellen bezeichnet (sie besitzen eine invariante V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281 TCR-Kette zusammen mit einer V $\beta$ 2, -7 oder -8 TCR-Kette). In einem Transplantationsmodell an der Maus konnte für V $\alpha$ 14-NKT-Zellen eine Funktion in der Induktion von Toleranz gezeigt werden. So war es V $\alpha$ 14-NKT-defizienten Mäusen nicht möglich (im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen), durch anti-CD4-Behandlung eine Toleranz gegen Inselzell-Xenotransplantate aus der Ratte zu entwickeln. Durch adoptiven Transfer von V $\alpha$ 14-NKT-Zellen in die defizienten Empfängertiere ließ sich aber die Toleranz rekonstituieren<sup>95</sup>. In einem weiteren Modell konnten *Seino et al.* zeigen, dass V $\alpha$ 14-NKT-defiziente Mäuse nicht in der Lage waren, Toleranz gegenüber allogenen Herztransplantaten trotz Kostimulationsblockade mit anti-LFA-1 und

anti-ICAM-1 oder anti-B7-1 und anti-B7-2 zu entwickeln, während Wildtyp-Mäuse wiederum unter diesem Protokoll die Herztransplantate tolerierten<sup>170</sup>. Diese NK1.1 positiven wie  $\alpha\beta$ TCR positiven NKT-Zellen sind phänotypisch wie funktionell jedoch heterogen und müssen auf Grund ihrer CD4- und CD8-Expression sowie ihrer TCR-Spezifitäten in mehrere Subpopulationen unterteilt werden<sup>65</sup>. Die von uns beobachtete Abnahme der NKT-Zellen bei etwa gleicher Anzahl von NK-Zellen zwischen CCR4-defizienten und CCR4-positiven Mäusen 30 Tage nach Transplantation wirft hinsichtlich der bislang über NKT-Zellen erhaltenen Ergebnisse die Frage auf, ob neben den untersuchten protektiv und im Sinne einer Toleranzinduktion wirkenden NKT-Zellen auch Subtypen existieren, denen ein entscheidender Einfluss an der Transplantatabstoßung zukommt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse demonstrieren eine entscheidende Rolle des Chemokinrezeptors CCR4 - neben seiner untersuchten Funktion im Rahmen des septischen Schocks<sup>43</sup> und der unter bestimmten Bedingungen stattfindenden Rekrutierung von Gedächtnis-T-Zellen in die Haut<sup>34</sup> - im Rahmen der chronischen Transplantatabstoßung. Im klinischen Alltag kann durch adäquate immunsuppressive Therapien heute in der überwiegenden Anzahl der Fälle eine akute Abstoßungsphase nach erfolgter Transplantation beherrscht werden, wohingegen die Langzeitresultate nach wie vor nicht verbessert werden konnten. Hauptsächlich ist dieser späte Transplantatverlust durch eine chronische Abstoßung bedingt, deren Mechanismus und demzufolge auch entsprechende Therapiemöglichkeiten bislang nicht ausreichend bekannt sind. Die viel versprechenden Ansätze dieser Arbeit mit der Herausarbeitung eines auf das chronische Transplantatversagen einwirkenden Rezeptors könnten dahingehend fortgesetzt werden, das Langzeitüberleben allogener Transplantate unter gleichzeitiger Inaktivierung anderer am chronischen Abstoßungsprozess beteiligten Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren im Mausmodell zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den Mechanismen der akuten wie chronischen Abstoßung nach allogener Herztransplantation in der Maus. Bei der akuten zellulären Transplantatabstoßung handelt es sich um ein durch T-Lymphozyten vermitteltes Geschehen. Hierbei wird das als fremd erkannte Spendergewebe über die Aktivierung von T-Lymphozyten durch Interaktion des zelleigenen TCR mit MHC-assoziierten Antigenstrukturen des Spenders abgestoßen. Im Rahmen des chronischen Transplantatversagens spielen neben nichtimmunologischen Faktoren ebenfalls immunologische Reaktionen gegen das transplantierte Gewebe eine entscheidende Rolle. In beiden Fällen, sowohl der akuten Abstoßungsphase als auch dem chronischen Transplantatversagen, muss eine direkte Interaktion von fremdem Gewebe und körpereigenen Effektor-T-Zellen gewährleistet sein, um eine Abstoßungsreaktion zu bewirken. Für diesen Schritt scheinen die Chemokine von großer Bedeutung zu sein, da sie unter anderem an der Leukozyteninteraktion mit vaskulärem Endothel im Rahmen der Leukozytenwanderung beteiligt sind. Die immunologischen Reaktionen gegen Transplantate sind bisher jedoch nur unzureichend geklärt. Angesichts der entscheidenden Rolle, die den Chemokinen in der Regulierung von Immunreaktionen gegen Transplantate zugesprochen wird, war es eine interessante Fragestellung, inwieweit sich das Fehlen des Oberflächenrezeptors CCR4 im Modell der heterotopen Herztransplantation in der Maus auf das Abstoßungsverhalten des Transplantates auswirkt.

Es ließ sich zeigen, dass der CCR4-Defekt allein nicht ausreicht, um ein längerfristiges Transplantatüberleben vollallogener Spenderherzen zu gewährleisten. So wurde in den CCR4<sup>-/-</sup> Mäusen eine lediglich geringgradige Verlängerung der Herzaktion um ein bis zwei Tage festgestellt. Ebenfalls ließ sich histologisch sowie immunhistochemisch kein Unterschied im zellulären Infiltrat zwischen Wildtyp und CCR4-defizienten Mäusen nachweisen. Für die Untersuchung des Abstoßungsverhaltens allogener Herztransplantate im chronischen Modell kam das in verschiedenen anderen experimentellen Studien bereits angewandte Medikament Galliumnitrat zum Einsatz. Dosisabhängig ließ sich ein Transplantatüberleben von länger als 60 Tagen erzielen. In den kinetischen Untersuchungen konnte ein deutlich verlängertes Bestehen der Herzaktion für die CCR4<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zur Wildtypkontrolle gesichert werden, wobei der Hauptteil der transplantierten Herzen bei den Wildtyp-Mäusen zwischen dem 60. und 100. postoperativen Tag abgestoßen wurde.

Für die meisten Herzen in CCR4-defizienten Mäusen konnte dagegen eine über den 100. postoperativen Tag hinaus stattfindende Herzkontraktion nachgewiesen werden. Das zelluläre Infiltrat in Herztransplantaten wurde immunhistochemisch sowie durchflusszytometrisch untersucht (nach Kollagenase-Verdau der Transplantate und Aufreinigung der mononukleären Zellen durch Perkoll-Dichtegradienten-Zentrifugation; durchgeführt von Christine Tertilt / TU München). Es konnte gezeigt werden, dass eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen geringgradigere NKT- sowie verstärkte CD8-T-Zellinfiltration in die allogenen Herztransplantate stattfand. In der Elastica van Gieson Färbung ließ sich eine nur leicht milder ausgeprägte Intimaproliferation der Gefäße in chronisch abgestoßenen CCR4-defizienten Mäusen beobachten.

Die erzielten Ergebnisse demonstrieren eine bislang unbekannte Rolle des Chemokinrezeptors CCR4 vornehmlich in der chronischen Phase stattfindender Abstoßungsreaktionen gegen solide Organtransplantate.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Abbas, A.K., Murphy, K.M. and Sher, A.:** Functional diversity of helper T lymphocytes, *Nature*, 383, 1996, 787-793.
2. **Adams, D.H., Russell, M.E., Hancock, W.W., Sayegh, M.H., Wyner, L.R. and Karnovsky, M.J.:** Chronic rejection in experimental cardiac transplantation: studies in the Lewis-F344 model, *Immunol Rev*, 134, 1993, 5-19.
3. **Almond, P.S., Matas, A., Gillingham, K., Dunn, D.L., Payne, W.D., Gores, P., Gruessner, R. and Najarian, J.S.:** Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients, *Transplantation*, 55, 1993, 752-756; discussion 756-757.
4. **Andrew, D.P., Chang, M.S., McNinch, J., Wathen, S.T., Rihanek, M., Tseng, J., Spellberg, J.P. and Elias, C.G.:** STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13, *J Immunol*, 161, 1998, 5027-5038.
5. **Anton, L.C., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R.:** MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies, *J Immunol*, 158, 1997, 2535-2542.
6. **Azuma, H. and Tilney, N.L.:** Chronic graft rejection, *Curr Opin Immunol*, 6, 1994, 770-776.
7. **Azzawi, M., Hasleton, P.S., Geraghty, P.J., Yonan, N., Krysiak, P., El-Gammal, A., Deiraniya, A.K. and Hutchinson, I.V.:** RANTES chemokine expression is related to acute cardiac cellular rejection and infiltration by CD45RO T-lymphocytes and macrophages, *J Heart Lung Transplant*, 17, 1998, 881-887.
8. **Baggiolini, M.:** Chemokines and leukocyte traffic, *Nature*, 392, 1998, 565-568.
9. **Baggiolini, M., Dewald, B. and Moser, B.:** Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines, *Adv Immunol*, 55, 1994, 97-179.
10. **Baggiolini, M., Dewald, B. and Moser, B.:** Human chemokines: an update, *Annu Rev Immunol*, 15, 1997, 675-705.
11. **Baggiolini, M., Walz, A. and Kunkel, S.L.:** Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils, *J Clin Invest*, 84, 1989, 1045-1049.
12. **Barrett, M., Milton, A.D., Barrett, J., Taube, D., Bewick, M., Parsons, V.P. and Fabre, J.W.:** Needle biopsy evaluation of class II major histocompatibility complex antigen expression for the differential diagnosis of cyclosporine nephrotoxicity from kidney graft rejection, *Transplantation*, 44, 1987, 223-227.
13. **Basadonna, G.P., Matas, A.J., Gillingham, K.J., Payne, W.D., Dunn, D.L., Sutherland, D.E., Gores, P.F., Gruessner, R.W. and Najarian, J.S.:** Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection, *Transplantation*, 55, 1993, 993-995.
14. **Basham, T.Y. and Merigan, T.C.:** Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression, *J Immunol*, 130, 1983, 1492-1494.
15. **Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A. and Schall, T.J.:** A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif, *Nature*, 385, 1997, 640-644.
16. **Ben-Baruch, A., Michiel, D.F. and Oppenheim, J.J.:** Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells, *J Biol Chem*, 270, 1995, 11703-11706.
17. **Bia, M.J.:** Nonimmunologic causes of late renal graft loss, *Kidney Int*, 47, 1995, 1470-1480.
18. **Bijur, S.:** Current concepts in the immunology of allograft rejection, *Indian J Med Sci*, 50, 1996, 13-19.
19. **Billingham, M.E.:** Pathology of human cardiac transplantation, *Monogr Pathol*, 37, 1995, 108-128.
20. **Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. and Wiley, D.C.:** The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens, *Nature*, 329, 1987, 512-518.
21. **Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. and Wiley, D.C.:** Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2, *Nature*, 329, 1987, 506-512.
22. **Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A. and Sinigaglia, F.:** Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s, *J Exp Med*, 187, 1998, 129-134.

23. **Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L. and Vignais, P.:** Synthesis and use of a novel N-formyl peptide derivative to isolate a human N-formyl peptide receptor cDNA, *Biochem Biophys Res Commun*, 168, 1990, 1103-1109.
24. **Bradley, J.A., Mason, D.W. and Morris, P.J.:** Evidence that rat renal allografts are rejected by cytotoxic T cells and not by nonspecific effectors, *Transplantation*, 39, 1985, 169-175.
25. **Bradley, J.A., Mowat, A.M. and Bolton, E.M.:** Processed MHC class I alloantigen as the stimulus for CD4+ T-cell dependent antibody-mediated graft rejection, *Immunol Today*, 13, 1992, 434-438.
26. **Braun, M.Y., McCormack, A., Webb, G. and Batchelor, J.R.:** Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization, *Transplantation*, 55, 1993, 177-182.
27. **Brenner, B.M.:** Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of kidney disease, *Kidney Int*, 23, 1983, 647-655.
28. **Brenner, B.M., Cohen, R.A. and Milford, E.L.:** In renal transplantation, one size may not fit all, *J Am Soc Nephrol*, 3, 1992, 162-169.
29. **Brown, D.R., Fowell, D.J., Corry, D.B., Wynn, T.A., Moskowitz, N.H., Cheever, A.W., Locksley, R.M. and Reiner, S.L.:** Beta 2-microglobulin-dependent NK1.1+ T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses, *J Exp Med*, 184, 1996, 1295-1304.
30. **Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. and Wiley, D.C.:** Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1, *Nature*, 364, 1993, 33-39.
31. **Buer, J., Aifantis, I., DiSanto, J.P., Fehling, H.J. and von Boehmer, H.:** Role of different T cell receptors in the development of pre-T cells, *J Exp Med*, 185, 1997, 1541-1547.
32. **Butcher, E.C.:** Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity, *Cell*, 67, 1991, 1033-1036.
33. **Butcher, E.C. and Picker, L.J.:** Lymphocyte homing and homeostasis, *Science*, 272, 1996, 60-66.
34. **Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D.P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., Wu, L. and Butcher, E.C.:** The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells, *Nature*, 400, 1999, 776-780.
35. **Cantrell, D.A. and Smith, K.A.:** Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth, *J Exp Med*, 158, 1983, 1895-1911.
36. **Chan, S.Y., DeBruyne, L.A., Goodman, R.E., Eichwald, E.J. and Bishop, D.K.:** In vivo depletion of CD8+ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection, *Transplantation*, 59, 1995, 1155-1161.
37. **Chavin, K.D., Qin, L., Lin, J., Yagita, H. and Bromberg, J.S.:** Combined anti-CD2 and anti-CD3 receptor monoclonal antibodies induce donor-specific tolerance in a cardiac transplant model, *J Immunol*, 151, 1993, 7249-7259.
38. **Chen, N., Gao, Q. and Field, E.H.:** Prevention of Th1 response is critical for tolerance, *Transplantation*, 61, 1996, 1076-1083.
39. **Chitambar, C.R., Matthaeus, W.G., Antholine, W.E., Graff, K. and O'Brien, W.J.:** Inhibition of leukemic HL60 cell growth by transferrin-gallium: effects on ribonucleotide reductase and demonstration of drug synergy with hydroxyurea, *Blood*, 72, 1988, 1930-1936.
40. **Chitambar, C.R., Narasimhan, J., Guy, J., Sem, D.S. and O'Brien, W.J.:** Inhibition of ribonucleotide reductase by gallium in murine leukemic L1210 cells, *Cancer Res*, 51, 1991, 6199-6201.
41. **Chitambar, C.R. and Seligman, P.A.:** Effects of different transferrin forms on transferrin receptor expression, iron uptake, and cellular proliferation of human leukemic HL60 cells. Mechanisms responsible for the specific cytotoxicity of transferrin-gallium, *J Clin Invest*, 78, 1986, 1538-1546.
42. **Chitambar, C.R. and Zivkovic, Z.:** Uptake of gallium-67 by human leukemic cells: demonstration of transferrin receptor-dependent and transferrin-independent mechanisms, *Cancer Res*, 47, 1987, 3929-3934.
43. **Chvatchko, Y., Hoogewerf, A.J., Meyer, A., Alouani, S., Juillard, P., Buser, R., Conquet, F., Proudfoot, A.E., Wells, T.N. and Power, C.A.:** A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock, *J Exp Med*, 191, 2000, 1755-1764.
44. **Ciubotariu, R., Liu, Z., Colovai, A.I., Ho, E., Itescu, S., Ravalli, S., Hardy, M.A., Cortesini, R., Rose, E.A. and Suci-Foca, N.:** Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts, *J Clin Invest*, 101, 1998, 398-405.
45. **Cui, J., Watanabe, N., Kawano, T., Yamashita, M., Kamata, T., Shimizu, C., Kimura, M., Shimizu, E., Koike, J., Koseki, H., Tanaka, Y., Taniguchi, M. and Nakayama, T.:** Inhibition of T helper cell type 2 cell differentiation and immunoglobulin E response by ligand-activated Valpha14 natural killer T cells, *J Exp Med*, 190, 1999, 783-792.

46. **Czitrom, A.A.:** The immune response: the afferent arm, *Clin Orthop*, 1996, 11-24.
47. **Daar, A.S., Fuggle, S.V., Fabre, J.W., Ting, A. and Morris, P.J.:** The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs, *Transplantation*, 38, 1984, 287-292.
48. **Daar, A.S., Fuggle, S.V., Fabre, J.W., Ting, A. and Morris, P.J.:** The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs, *Transplantation*, 38, 1984, 293-298.
49. **D'Ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A. and Sinigaglia, F.:** Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells, *J Immunol*, 161, 1998, 5111-5115.
50. **Darby, C.R., Morris, P.J. and Wood, K.J.:** Evidence that long-term cardiac allograft survival induced by anti-CD4 monoclonal antibody does not require depletion of CD4+ T cells, *Transplantation*, 54, 1992, 483-490.
51. **Dausset, J.:** The major histocompatibility complex in man, *Science*, 213, 1981, 1469-1474.
52. **Dmoszynska, A. and Rolinski, J.:** [Interleukin 2 receptor (II-2): structure and function], *Acta Haematol Pol*, 26, 1995, 257-262.
53. **Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J.:** Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors, *Annu Rev Biochem*, 60, 1991, 653-688.
54. **Dresske, B., Zhu, X., Herwartz, C., Brotzmann, K. and Fandrich, F.:** The time pattern of organ infiltration and distribution of natural killer cells and macrophages in the course of acute graft rejection after allogeneic heart transplantation in the rat, *Transplant Proc*, 29, 1997, 1715-1716.
55. **Fishbein, M.C., Bell, G., Lones, M.A., Czer, L.S., Miller, J.M., Harasty, D. and Trento, A.:** Grade 2 cellular heart rejection: does it exist?, *J Heart Lung Transplant*, 13, 1994, 1051-1057.
56. **Flechner, S.M., Modlin, C.S., Serrano, D.P., Goldfarb, D.A., Papajcik, D., Mastroianni, B., Goormastic, M. and Novick, A.C.:** Determinants of chronic renal allograft rejection in cyclosporine- treated recipients, *Transplantation*, 62, 1996, 1235-1241.
57. **Forbes, R.D. and Guttman, R.D.:** Pathogenetic studies of cardiac allograft rejection using inbred rat models, *Immunol Rev*, 77, 1984, 5-29.
58. **Forbes, R.D., Rowan, R.A. and Billingham, M.E.:** Endocardial infiltrates in human heart transplants: a serial biopsy analysis comparing four immunosuppression protocols, *Hum Pathol*, 21, 1990, 850-855.
59. **Fuggle, S.V., McWhinnie, D.L., Chapman, J.R., Taylor, H.M. and Morris, P.J.:** Sequential analysis of HLA-class II antigen expression in human renal allografts. Induction of tubular class II antigens and correlation with clinical parameters, *Transplantation*, 42, 1986, 144-150.
60. **Gao, W., Faia, K.L., Csizmadia, V., Smiley, S.T., Soler, D., King, J.A., Danoff, T.M. and Hancock, W.W.:** Beneficial effects of targeting CCR5 in allograft recipients, *Transplantation*, 72, 2001, 1199-1205.
61. **Gao, W., Topham, P.S., King, J.A., Smiley, S.T., Csizmadia, V., Lu, B., Gerard, C.J. and Hancock, W.W.:** Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection, *J Clin Invest*, 105, 2000, 35-44.
62. **Garcia-Zepeda, E.A., Combadiere, C., Rothenberg, M.E., Sarafi, M.N., Lavigne, F., Hamid, Q., Murphy, P.M. and Luster, A.D.:** Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3, *J Immunol*, 157, 1996, 5613-5626.
63. **Garcia-Zepeda, E.A., Rothenberg, M.E., Ownbey, R.T., Celestin, J., Leder, P. and Luster, A.D.:** Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia, *Nat Med*, 2, 1996, 449-456.
64. **Gjertson, D.W.:** Survival trends in long-term first cadaver-donor kidney transplants, *Clin Transpl*, 1991, 225-235.
65. **Godfrey, D.I., Hammond, K.J., Poulton, L.D., Smyth, M.J. and Baxter, A.G.:** NKT cells: facts, functions and fallacies, *Immunol Today*, 21, 2000, 573-583.
66. **Godiska, R., Chantry, D., Raport, C.J., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., Mantovani, A. and Gray, P.W.:** Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells, *J Exp Med*, 185, 1997, 1595-1604.
67. **Gonzalo, J.A., Pan, Y., Lloyd, C.M., Jia, G.Q., Yu, G., Dussault, B., Powers, C.A., Proudfoot, A.E., Coyle, A.J., Gearing, D. and Gutierrez-Ramos, J.C.:** Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation, *J Immunol*, 163, 1999, 403-411.
68. **Gould, D.S. and Auchincloss, H., Jr.:** Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection, *Immunol Today*, 20, 1999, 77-82.

69. **Gretz, J.E., Kaldjian, E.P., Anderson, A.O. and Shaw, S.:** Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic, *J Immunol*, 157, 1996, 495-499.
70. **Guery, J.C., Galbiati, F., Smioldo, S. and Adorini, L.:** Selective development of T helper (Th)2 cells induced by continuous administration of low dose soluble proteins to normal and beta(2)-microglobulin-deficient BALB/c mice, *J Exp Med*, 183, 1996, 485-497.
71. **Haeney, M.:** The immunological background to transplantation, *J Antimicrob Chemother*, 36 Suppl B, 1995, 1-9.
72. **Hall, B.M.:** Cells mediating allograft rejection, *Transplantation*, 51, 1991, 1141-1151.
73. **Hancock, W.H., Whitley, W.D., Tullius, S.G., Heemann, U.W., Wasowska, B., Baldwin, W.M., 3rd and Tilney, N.L.:** Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts, *Transplantation*, 56, 1993, 643-650.
74. **Hancock, W.W.:** Chemokines and transplant immunobiology, *J Am Soc Nephrol*, 13, 2002, 821-824.
75. **Hancock, W.W., Gao, W., Csizmadia, V., Faia, K.L., Shemmeri, N. and Luster, A.D.:** Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection, *J Exp Med*, 193, 2001, 975-980.
76. **Hancock, W.W., Gao, W., Faia, K.L. and Csizmadia, V.:** Chemokines and their receptors in allograft rejection, *Curr Opin Immunol*, 12, 2000, 511-516.
77. **Hancock, W.W., Lord, R.H., Colby, A.J., Diamantstein, T., Rickles, F.R., Dijkstra, C., Hogg, N. and Tilney, N.L.:** Identification of IL 2R+ T cells and macrophages within rejecting rat cardiac allografts, and comparison of the effects of treatment with anti-IL 2R monoclonal antibody or cyclosporin, *J Immunol*, 138, 1987, 164-170.
78. **Hancock, W.W., Lu, B., Gao, W., Csizmadia, V., Faia, K., King, J.A., Smiley, S.T., Ling, M., Gerard, N.P. and Gerard, C.:** Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection, *J Exp Med*, 192, 2000, 1515-1520.
79. **Hancock, W.W., Shi, C., Picard, M.H., Bianchi, C. and Russell, M.E.:** LEW-to-F344 carotid artery allografts: analysis of a rat model of posttransplant vascular injury involving cell-mediated and humoral responses, *Transplantation*, 60, 1995, 1565-1572.
80. **Harris, H.W. and Gill, T.J.:** Expression of class I transplantation antigens, *Transplantation*, 42, 1986, 109-117.
81. **Harris, W.R. and Pecoraro, V.L.:** Thermodynamic binding constants for gallium transferrin, *Biochemistry*, 22, 1983, 292-299.
82. **Haskell, C.A., Hancock, W.W., Salant, D.J., Gao, W., Csizmadia, V., Peters, W., Faia, K., Fituri, O., Rottman, J.B. and Charo, I.F.:** Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection, *J Clin Invest*, 108, 2001, 679-688.
83. **Hathaway, D.K., Combs, C., De Geest, S., Stergachis, A. and Moore, L.W.:** Patient compliance in transplantation: a report on the perceptions of transplant clinicians, *Transplant Proc*, 31, 1999, 10S-13S.
84. **Hayry, P., Isoniemi, H., Yilmaz, S., Mennander, A., Lemstrom, K., Raisanen-Sokolowski, A., Koskinen, P., Ustinov, J., Lautenschlager, I., Taskinen, E. and et al.:** Chronic allograft rejection, *Immunol Rev*, 134, 1993, 33-81.
85. **Heath, W.R., Hurd, M.E., Carbone, F.R. and Sherman, L.A.:** Peptide-dependent recognition of H-2Kb by alloreactive cytotoxic T lymphocytes, *Nature*, 341, 1989, 749-752.
86. **Hegge, F.N., Mahler, D.J. and Larson, S.M.:** The incorporation of Ga-67 into the ferritin fraction of rabbit hepatocytes in vivo, *J Nucl Med*, 18, 1977, 937-939.
87. **Heidenreich, S., August, C. and Lang, D.:** [Long-term problems after kidney transplantations], *Med Klin*, 95, 2000, 261-266.
88. **Held, P.J., Kahan, B.D., Hunsicker, L.G., Liska, D., Wolfe, R.A., Port, F.K., Gaylin, D.S., Garcia, J.R., Agodoa, L.Y. and Krakauer, H.:** The impact of HLA mismatches on the survival of first cadaveric kidney transplants, *N Engl J Med*, 331, 1994, 765-770.
89. **Hood, L., Steinmetz, M., Goodenow, R., Eakle, K., Fisher, D., Kobori, J., Malissen, B., Malissen, M., McMillan, M., McNicholas, J., Orn, A., Pecht, M., Sher, B.T., Smith, L., Stroynowski, I., Sun, H., Winoto, A. and Zuniga, M.:** Genes of the major histocompatibility complex, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 47, 1983, 1051-1065.
90. **Hood, L., Steinmetz, M. and Malissen, B.:** Genes of the major histocompatibility complex of the mouse, *Annu Rev Immunol*, 1, 1983, 529-568.

91. **Horuk, R., Clayberger, C., Krensky, A.M., Wang, Z., Grone, H.J., Weber, C., Weber, K.S., Nelson, P.J., May, K., Rosser, M., Dunning, L., Liang, M., Buckman, B., Ghannam, A., Ng, H.P., Islam, I., Bauman, J.G., Wei, G.P., Monahan, S., Xu, W., Snider, R.M., Morrissey, M.M., Hesselgesser, J. and Perez, H.D.:** A non-peptide functional antagonist of the CCR1 chemokine receptor is effective in rat heart transplant rejection, *J Biol Chem*, 276, 2001, 4199-4204.
92. **Hostetter, T.H.:** Chronic transplant rejection, *Kidney Int*, 46, 1994, 266-279.
93. **Hostetter, T.H., Olson, J.L., Rennke, H.G., Venkatachalam, M.A. and Brenner, B.M.:** Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation, *Am J Physiol*, 241, 1981, F85-93.
94. **Huang, E.H., Gabler, D.M., Krecic, M.E., Gerber, N., Ferguson, R.M. and Orosz, C.G.:** Differential effects of gallium nitrate on T lymphocyte and endothelial cell activation, *Transplantation*, 58, 1994, 1216-1222.
95. **Ikehara, Y., Yasunami, Y., Kodama, S., Maki, T., Nakano, M., Nakayama, T., Taniguchi, M. and Ikeda, S.:** CD4(+) Valpha14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice, *J Clin Invest*, 105, 2000, 1761-1767.
96. **Imai, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S. and Yoshie, O.:** The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4, *J Biol Chem*, 272, 1997, 15036-15042.
97. **Imai, T., Chantry, D., Raport, C.J., Wood, C.L., Nishimura, M., Godiska, R., Yoshie, O. and Gray, P.W.:** Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4, *J Biol Chem*, 273, 1998, 1764-1768.
98. **Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P.W., Matsushima, K. and Yoshie, O.:** Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine, *Int Immunol*, 11, 1999, 81-88.
99. **Inngjerdigen, M., Damaj, B. and Maghazachi, A.A.:** Human NK cells express CC chemokine receptors 4 and 8 and respond to thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine, and I-309, *J Immunol*, 164, 2000, 4048-4054.
100. **Isoniemi, H., Kyllonen, L., Eklund, B., Hockerstedt, K., Salmela, K., von Willebrand, E. and Ahonen, J.:** Acute rejection under triple immunosuppressive therapy does not increase the risk of late first cadaveric renal allograft loss, *Transplant Proc*, 27, 1995, 875-877.
101. **Izzo, R.S., Witkon, K., Chen, A.I., Hadjiyane, C., Weinstein, M.I. and Pellicchia, C.:** Interleukin-8 and neutrophil markers in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis, *Am J Gastroenterol*, 87, 1992, 1447-1452.
102. **Jardetzky, T.S., Brown, J.H., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Chi, Y.I., Stauffacher, C., Strominger, J.L. and Wiley, D.C.:** Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen, *Nature*, 368, 1994, 711-718.
103. **Kasiske, B.L.:** Role of circulating lipid abnormalities in chronic renal allograft rejection, *Kidney Int Suppl*, 71, 1999, S28-30.
104. **Kasiske, B.L., Neylan, J.F., Riggio, R.R., Danovitch, G.M., Kahana, L., Alexander, S.R. and White, M.G.:** The effect of race on access and outcome in transplantation, *N Engl J Med*, 324, 1991, 302-307.
105. **Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Taura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H. and Taniguchi, M.:** CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides, *Science*, 278, 1997, 1626-1629.
106. **Kennedy, J., Kelner, G.S., Kleyensteuber, S., Schall, T.J., Weiss, M.C., Yssel, H., Schneider, P.V., Cocks, B.G., Bacon, K.B. and Zlotnik, A.:** Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin, *J Immunol*, 155, 1995, 203-209.
107. **Kim, C.H., Johnston, B. and Butcher, E.C.:** Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity, *Blood*, 100, 2002, 11-16.
108. **Kruisbeek, A.M.:** Development of alpha beta T cells, *Curr Opin Immunol*, 5, 1993, 227-234.
109. **Lang, T., Krams, S.M. and Martinez, O.M.:** Production of IL-4 and IL-10 does not lead to immune quiescence in vascularized human organ grafts, *Transplantation*, 62, 1996, 776-780.
110. **Larson, S.M., Rasey, J.S., Allen, D.R., Nelson, N.J., Grunbaum, Z., Harp, G.D. and Williams, D.L.:** Common pathway for tumor cell uptake of gallium-67 and iron-59 via a transferrin receptor, *J Natl Cancer Inst*, 64, 1980, 41-53.
111. **Laudanna, C., Campbell, J.J. and Butcher, E.C.:** Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins, *Science*, 271, 1996, 981-983.

112. **Lechler, R.I. and Batchelor, J.R.:** Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells, *J Exp Med*, 155, 1982, 31-41.
113. **Lee, P.T., Benlagha, K., Teyton, L. and Bendelac, A.:** Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells, *J Exp Med*, 195, 2002, 637-641.
114. **Lehtonen, S.R., Isoniemi, H.M., Salmela, K.T., Taskinen, E.I., von Willebrand, E.O., Ahonen, J.P. and vWillebrand, E.O.:** Long-term graft outcome is not necessarily affected by delayed onset of graft function and early acute rejection, *Transplantation*, 64, 1997, 103-107.
115. **Lemstrom, K., Koskinen, P. and Hayry, P.:** Molecular mechanisms of chronic renal allograft rejection, *Kidney Int Suppl*, 52, 1995, S2-10.
116. **Lieberam, I. and Forster, I.:** The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells, *Eur J Immunol*, 29, 1999, 2684-2694.
117. **Lindholm, A., Ohlman, S., Albrechtsen, D., Tufveson, G., Persson, H. and Persson, N.H.:** The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens, *Transplantation*, 56, 1993, 307-315.
118. **Lloyd, C.M., Delaney, T., Nguyen, T., Tian, J., Martinez, A.C., Coyle, A.J. and Gutierrez-Ramos, J.C.:** CC chemokine receptor (CCR)3/eotaxin is followed by CCR4/monocyte- derived chemokine in mediating pulmonary T helper lymphocyte type 2 recruitment after serial antigen challenge in vivo, *J Exp Med*, 191, 2000, 265-274.
119. **Loetscher, P., Uguccioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C. and Dayer, J.M.:** CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes, *Nature*, 391, 1998, 344-345.
120. **Lowry, R.P., Forbes, R.D., Blackburn, J.H. and Marghesco, D.M.:** Immune mechanisms in organ allograft rejection. V. Pivotal role of the cytotoxic-suppressor T cell subset in the rejection of heart grafts bearing isolated class I disparities in the inbred rat, *Transplantation*, 40, 1985, 545-550.
121. **Luster, A.D.:** Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation, *N Engl J Med*, 338, 1998, 436-445.
122. **Macatonia, S.E., Taylor, P.M., Knight, S.C. and Askonas, B.A.:** Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro, *J Exp Med*, 169, 1989, 1255-1264.
123. **MacDonald, H.R.:** NK1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells: new clues to their origin, specificity, and function, *J Exp Med*, 182, 1995, 633-638.
124. **Maier, S., Tertilt, C., Chambron, N., Gerauer, K., Huser, N., Heidecke, C.D. and Pfeffer, K.:** Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28-/- mice, *Nat Med*, 7, 2001, 557-562.
125. **Massy, Z.A., Guijarro, C., Wiederkehr, M.R., Ma, J.Z. and Kasiske, B.L.:** Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors, *Kidney Int*, 49, 1996, 518-524.
126. **Matas, A.J., Gillingham, K.J., Payne, W.D. and Najarian, J.S.:** The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2), *Transplantation*, 57, 1994, 857-859.
127. **Matkovic, V., Apseloff, G., Shepard, D.R. and Gerber, N.:** Use of gallium to treat Paget's disease of bone: a pilot study, *Lancet*, 335, 1990, 72-75.
128. **Meier-Kriesche, H.U., Ojo, A.O., Hanson, J.A., Cibrik, D.M., Punch, J.D., Leichtman, A.B. and Kaplan, B.:** Increased impact of acute rejection on chronic allograft failure in recent era, *Transplantation*, 70, 2000, 1098-1100.
129. **Melter, M., Exeni, A., Reinders, M.E., Fang, J.C., McMahon, G., Ganz, P., Hancock, W.W. and Briscoe, D.M.:** Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during human cardiac allograft rejection, *Circulation*, 104, 2001, 2558-2564.
130. **Meuer, S.C., Cooper, D.A., Hodgdon, J.C., Hussey, R.E., Fitzgerald, K.A., Schlossman, S.F. and Reinherz, E.L.:** Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes, *Science*, 222, 1983, 1239-1242.
131. **Milton, A.D., Spencer, S.C. and Fabre, J.W.:** The effects of cyclosporine on the induction of donor class I and class II MHC antigens in heart and kidney allografts in the rat, *Transplantation*, 42, 1986, 337-347.
132. **Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T. and Taniguchi, T.:** The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes, *Annu Rev Immunol*, 11, 1993, 245-268.
133. **Moore, K.W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P. and Mosmann, T.R.:** Interleukin-10, *Annu Rev Immunol*, 11, 1993, 165-190.
134. **Morris, P.J., Johnson, R.J., Fuggle, S.V., Belger, M.A. and Briggs, J.D.:** Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA), *Lancet*, 354, 1999, 1147-1152.

135. **Mulligan, M.S., McDuffie, J.E., Shanley, T.P., Guo, R.F., Vidya Sarma, J., Warner, R.L. and Ward, P.A.:** Role of RANTES in experimental cardiac allograft rejection, *Exp Mol Pathol*, 69, 2000, 167-174.
136. **Narasimhan, J., Antholine, W.E. and Chitambar, C.R.:** Effect of gallium on the tyrosyl radical of the iron-dependent M2 subunit of ribonucleotide reductase, *Biochem Pharmacol*, 44, 1992, 2403-2408.
137. **Nomiyama, H., Imai, T., Kusuda, J., Miura, R., Callen, D.F. and Yoshie, O.:** Assignment of the human CC chemokine gene TARC (SCYA17) to chromosome 16q13, *Genomics*, 40, 1997, 211-213.
138. **Onodera, K., Hancock, W.W., Graser, E., Lehmann, M., Sayegh, M.H., Strom, T.B., Volk, H.D. and Kupiec-Weglinski, J.W.:** Type 2 helper T cell-type cytokines and the development of "infectious" tolerance in rat cardiac allograft recipients, *J Immunol*, 158, 1997, 1572-1581.
139. **Orosz, C.G., Wakely, E., Bergese, S.D., VanBuskirk, A.M., Ferguson, R.M., Mullet, D., Apseloff, G. and Gerber, N.:** Prevention of murine cardiac allograft rejection with gallium nitrate. Comparison with anti-CD4 monoclonal antibody, *Transplantation*, 61, 1996, 783-791.
140. **Orosz, C.G., Wakely, E., Sedmak, D.D., Bergese, S.D. and VanBuskirk, A.M.:** Prolonged murine cardiac allograft acceptance: characteristics of persistent active alloimmunity after treatment with gallium nitrate versus anti-CD4 monoclonal antibody, *Transplantation*, 63, 1997, 1109-1117.
141. **Parfrey, P.S., Kuo, Y.L., Hanley, J.A., Knaack, J., Xue, Z., Lisbona, R. and Guttman, R.D.:** The diagnostic and prognostic value of renal allograft biopsy, *Transplantation*, 38, 1984, 586-590.
142. **Patel, R. and Terasaki, P.I.:** Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation, *N Engl J Med*, 280, 1969, 735-739.
143. **Paul, L.C.:** Chronic allograft nephropathy: An update, *Kidney Int*, 56, 1999, 783-793.
144. **Paul, L.C. and Fellstrom, B.:** Chronic vascular rejection of the heart and the kidney--have rational treatment options emerged?, *Transplantation*, 53, 1992, 1169-1179.
145. **Paul, L.C., Hayry, P., Foegh, M., Dennis, M.J., Mihatsch, M.J., Larsson, E. and Fellstrom, B.:** Diagnostic criteria for chronic rejection/accelerated graft atherosclerosis in heart and kidney transplants: joint proposal from the Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs, *Transplant Proc*, 25, 1993, 2022-2023.
146. **Pearson, T.C., Alexander, D.Z., Winn, K.J., Linsley, P.S., Lowry, R.P. and Larsen, C.P.:** Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig, *Transplantation*, 57, 1994, 1701-1706.
147. **Peeters, J., Roels, L. and Vanrenterghem, Y.:** Chronic renal allograft failure: clinical overview. The Leuven Collaborative Group for Transplantation, *Kidney Int Suppl*, 52, 1995, S97-101.
148. **Pelletier, R.P., Cosio, F., Henry, M.L., Bumgardner, G.L., Davies, E.A., Elkhammas, E.A. and Ferguson, R.M.:** Acute rejection following renal transplantation. Evidence that severity is the best predictor of subsequent graft survival time, *Clin Transplant*, 12, 1998, 543-552.
149. **Piccotti, J.R., Li, K., Chan, S.Y., Eichwald, E.J. and Bishop, D.K.:** Cytokine regulation of chronic cardiac allograft rejection: evidence against a role for Th1 in the disease process, *Transplantation*, 67, 1999, 1548-1555.
150. **Pichler, W.J.:** [Regulation of the immune response: the TH1/TH2 concept], *Schweiz Med Wochenschr*, 127, 1997, 341-348.
151. **Pirsch, J.D., D'Alessandro, A.M., Sollinger, H.W., Hoffmann, R.M., Roecker, E., Voss, B.J., Lorentzen, D., Knechtle, S.J., Reed, A., Kalayoglu, M. and et al.:** The effect of donor age, recipient age, and HLA match on immunologic graft survival in cadaver renal transplant recipients, *Transplantation*, 53, 1992, 55-59.
152. **Plain, K.M., Fava, L., Spinelli, A., He, X.Y., Chen, J., Boyd, R., Davidson, C.L. and Hall, B.M.:** Induction of tolerance with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibodies is associated with down-regulation of TH2 cytokines, *Transplantation*, 64, 1997, 1559-1567.
153. **Pober, J.S., Gimbrone, M.A., Cotran, R.S., Reiss, C.S., Burakoff, S.J., Fiers, W. and Ault, K.A.:** Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human gamma interferon, *J Exp Med*, 157, 1983, 1339-1353.
154. **Portmann, B., Slapak, G.I., Gane, E. and Williams, R.:** Pathology and biopsy diagnosis of the transplanted liver, *Verh Dtsch Ges Pathol*, 79, 1995, 277-290.
155. **Power, C.A., Clemetson, J.M., Clemetson, K.J. and Wells, T.N.:** Chemokine and chemokine receptor mRNA expression in human platelets, *Cytokine*, 7, 1995, 479-482.
156. **Power, C.A., Meyer, A., Nemeth, K., Bacon, K.B., Hoogewerf, A.J., Proudfoot, A.E. and Wells, T.N.:** Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line, *J Biol Chem*, 270, 1995, 19495-19500.
157. **Prieschl, E.E., Kulmburg, P.A. and Baumruker, T.:** The nomenclature of chemokines, *Int Arch Allergy Immunol*, 107, 1995, 475-483.

158. **Proost, P., Wuyts, A. and van Damme, J.:** The role of chemokines in inflammation, *Int J Clin Lab Res*, 26, 1996, 211-223.
159. **Proudfoot, A.E., Buser, R., Borlat, F., Alouani, S., Soler, D., Offord, R.E., Schroder, J.M., Power, C.A. and Wells, T.N.:** Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors, *J Biol Chem*, 274, 1999, 32478-32485.
160. **Rao, K.V., Kasiske, B.L., Odlund, M.D., Ney, A.L. and Andersen, R.C.:** Influence of cadaver donor age on posttransplant renal function and graft outcome, *Transplantation*, 49, 1990, 91-95.
161. **Reinherz, E.L., Meuer, S., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Levine, H. and Schlossman, S.F.:** Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex, *Cell*, 30, 1982, 735-743.
162. **Robinson, L.A., Nataraj, C., Thomas, D.W., Howell, D.N., Griffiths, R., Bautch, V., Patel, D.D., Feng, L. and Coffman, T.M.:** A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection, *J Immunol*, 165, 2000, 6067-6072.
163. **Rosenberg, A.S., Mizuochi, T., Sharrow, S.O. and Singer, A.:** Phenotype, specificity, and function of T cell subsets and T cell interactions involved in skin allograft rejection, *J Exp Med*, 165, 1987, 1296-1315.
164. **Russell, M.E., Wallace, A.F., Hancock, W.W., Sayegh, M.H., Adams, D.H., Sibinga, N.E., Wyner, L.R. and Karnovsky, M.J.:** Upregulation of cytokines associated with macrophage activation in the Lewis-to-F344 rat transplantation model of chronic cardiac rejection, *Transplantation*, 59, 1995, 572-578.
165. **Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C.R. and Lanzavecchia, A.:** Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes, *J Exp Med*, 187, 1998, 875-883.
166. **Sallusto, F., Mackay, C.R. and Lanzavecchia, A.:** Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells, *Science*, 277, 1997, 2005-2007.
167. **Salomon, R.N., Hughes, C.C., Schoen, F.J., Payne, D.D., Pober, J.S. and Libby, P.:** Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells, *Am J Pathol*, 138, 1991, 791-798.
168. **Sayegh, M.H., Akalin, E., Hancock, W.W., Russell, M.E., Carpenter, C.B., Linsley, P.S. and Turka, L.A.:** CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2, *J Exp Med*, 181, 1995, 1869-1874.
169. **Schaniel, C., Pardali, E., Sallusto, F., Speletas, M., Ruedl, C., Shimizu, T., Seidl, T., Andersson, J., Melchers, F., Rolink, A.G. and Sideras, P.:** Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells, *J Exp Med*, 188, 1998, 451-463.
170. **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.:** Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2001, 2577-2581.
171. **Shirwan, H.:** Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role?, *Transplantation*, 68, 1999, 715-726.
172. **Shirwan, H., Barwari, L. and Khan, N.S.:** Predominant expression of T helper 2 cytokines and altered expression of T helper 1 cytokines in long-term allograft survival induced by intrathymic immune modulation with donor class I major histocompatibility complex peptides, *Transplantation*, 66, 1998, 1802-1809.
173. **Shirwan, H., Leamer, M., Wang, H.K., Makowka, L. and Cramer, D.V.:** Peptides derived from alpha-helices of allogeneic class I major histocompatibility complex antigens are potent inducers of CD4+ and CD8+ T cell and B cell responses after cardiac allograft rejection, *Transplantation*, 59, 1995, 401-410.
174. **Shirwan, H., Wu, G.D., Barwari, L., Liu, A. and Cramer, D.V.:** Induction of allograft nonresponsiveness after intrathymic inoculation with donor class I allopeptides. II. Evidence for persistent chronic rejection despite high levels of donor microchimerism, *Transplantation*, 64, 1997, 1671-1676.
175. **Sibley, R.K. and Payne, W.:** Morphologic findings in the renal allograft biopsy, *Semin Nephrol*, 5, 1985, 294-306.
176. **Siciliano, S.J., Rollins, T.E., DeMartino, J., Konteatis, Z., Malkowitz, L., Van Riper, G., Bondy, S., Rosen, H. and Springer, M.S.:** Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative binding paradigm for G protein-coupled receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 1994, 1214-1218.
177. **Snover, D.C.:** General aspects of the pathology of rejection of kidney and liver in the early posttransplant period, *Transplant Proc*, 25, 1993, 2649-2651.

178. **Snover, D.C., Sibley, R.K., Freese, D.K., Sharp, H.L., Bloomer, J.R., Najarian, J.S. and Ascher, N.L.:** Orthotopic liver transplantation: a pathological study of 63 serial liver biopsies from 17 patients with special reference to the diagnostic features and natural history of rejection, *Hepatology*, 4, 1984, 1212-1222.
179. **Solez, K., Axelsen, R.A., Benediktsson, H., Burdick, J.F., Cohen, A.H., Colvin, R.B., Croker, B.P., Droz, D., Dunnill, M.S., Halloran, P.F. and et al.:** International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology, *Kidney Int*, 44, 1993, 411-422.
180. **Springer, T.A.:** Adhesion receptors of the immune system, *Nature*, 346, 1990, 425-434.
181. **Springer, T.A.:** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell*, 76, 1994, 301-314.
182. **Springer, T.A.:** Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration, *Annu Rev Physiol*, 57, 1995, 827-872.
183. **Springer, T.A., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K. and Marlin, S.D.:** The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system, *Annu Rev Immunol*, 5, 1987, 223-252.
184. **Steinmetz, M., Winoto, A., Minard, K. and Hood, L.:** Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens, *Cell*, 28, 1982, 489-498.
185. **Steinmuller, D.:** Which T cells mediate allograft rejection?, *Transplantation*, 40, 1985, 229-233.
186. **Takeuchi, T., Lowry, R.P. and Konieczny, B.:** Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2- like effector cells in peripheral tolerance, *Transplantation*, 53, 1992, 1281-1294.
187. **Tejani, A., Cortes, L. and Stablein, D.:** Clinical correlates of chronic rejection in pediatric renal transplantation. A report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study, *Transplantation*, 61, 1996, 1054-1058.
188. **Terasaki, P.I., Yuge, J., Cecka, J.M., Gjertson, D.W., Takemoto, S. and Cho, Y.:** Thirty-year trends in clinical kidney transplantation, *Clin Transpl*, 1993, 553-562.
189. **Tesi, R.J., Elkhammas, E.A., Henry, M.L., Davies, E.A., Salazar, A. and Ferguson, R.M.:** Acute rejection episodes: best predictor of long-term primary cadaveric renal transplant survival, *Transplant Proc*, 25, 1993, 901-902.
190. **Tilney, N.L. and Kupiec-Weglinski, J.W.:** The biology of acute transplant rejection, *Ann Surg*, 214, 1991, 98-106.
191. **Tullius, S.G., Heemann, U., Hancock, W.W., Azuma, H. and Tilney, N.L.:** Long-term kidney isografts develop functional and morphologic changes that mimic those of chronic allograft rejection, *Ann Surg*, 220, 1994, 425-432; discussion 432-425.
192. **Tullius, S.G. and Tilney, N.L.:** Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection, *Transplantation*, 59, 1995, 313-318.
193. **Uretsky, B.F., Murali, S., Reddy, P.S., Rabin, B., Lee, A., Griffith, B.P., Hardesty, R.L., Trento, A. and Bahnson, H.T.:** Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone, *Circulation*, 76, 1987, 827-834.
194. **van Ewijk, W.:** T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments, *Annu Rev Immunol*, 9, 1991, 591-615.
195. **van Saase, J.L., van der Woude, F.J., Thorogood, J., Hollander, A.A., van Es, L.A., Weening, J.J., van Bockel, J.H. and Bruijn, J.A.:** The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection, *Transplantation*, 59, 1995, 1280-1285.
196. **Van Seventer, G.A., Shimizu, Y., Horgan, K.J., Luce, G.E., Webb, D. and Shaw, S.:** Remote T cell co-stimulation via LFA-1/ICAM-1 and CD2/LFA-3: demonstration with immobilized ligand/mAb and implication in monocyte- mediated co-stimulation, *Eur J Immunol*, 21, 1991, 1711-1718.
197. **Vella, J.P., Spadafora-Ferreira, M., Murphy, B., Alexander, S.I., Harmon, W., Carpenter, C.B. and Sayegh, M.H.:** Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction, *Transplantation*, 64, 1997, 795-800.
198. **Vereerstraeten, P., Abramowicz, D., de Pauw, L. and Kinnaert, P.:** Absence of deleterious effect on long-term kidney graft survival of rejection episodes with complete functional recovery, *Transplantation*, 63, 1997, 1739-1743.
199. **Wells, T.N., Lusti-Narasimhan, M., Chung, C.W., Cooke, R., Power, C.A., Peitsch, M.C. and Proudfoot, A.E.:** The molecular basis of selectivity between CC and CXC chemokines: the possibility of chemokine antagonists as anti-inflammatory agents, *Ann N Y Acad Sci*, 796, 1996, 245-256.

200. **Whitacre, C., Apseloff, G., Cox, K., Matkovic, V., Jewell, S. and Gerber, N.:** Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by gallium nitrate, *J Neuroimmunol*, 39, 1992, 175-181.
201. **Yeoh, T.K., Frist, W.H., Eastburn, T.E. and Atkinson, J.:** Clinical significance of mild rejection of the cardiac allograft, *Circulation*, 86, 1992, II267-271.
202. **Yoneyama, H., Harada, A., Imai, T., Baba, M., Yoshie, O., Zhang, Y., Higashi, H., Murai, M., Asakura, H. and Matsushima, K.:** Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria-induced fulminant hepatic failure in mice, *J Clin Invest*, 102, 1998, 1933-1941.
203. **Yoshie, O., Imai, T. and Nomiya, H.:** Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors, *J Leukoc Biol*, 62, 1997, 634-644.
204. **Yoshimoto, T., Bendelac, A., Watson, C., Hu-Li, J. and Paul, W.E.:** Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production, *Science*, 270, 1995, 1845-1847.
205. **Zhang, Y., Rogers, K.H. and Lewis, D.B.:** Beta 2-microglobulin-dependent T cells are dispensable for allergen-induced T helper 2 responses, *J Exp Med*, 184, 1996, 1507-1512.
206. **Zhong, G., Reis e Sousa, C. and Germain, R.N.:** Production, specificity, and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide-major histocompatibility complex class II complexes formed by processing of exogenous protein, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1997, 13856-13861.
207. **Zhou, Y.C. and Cecka, J.M.:** Effect of HLA matching on renal transplant survival, *Clin Transpl*, 1993, 499-510.
208. **Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J.A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C.T., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., O'Garra, A., Robinson, D., Rocchi, M., Santoni, A., Zlotnik, A. and Napolitano, M.:** The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells, *J Immunol*, 161, 1998, 547-551.

### **Danksagung:**

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit entstehen konnte.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Claus-Dieter Heidecke für die überaus interessante Themenstellung. Trotz seiner Berufung an die Universitätsklinik Greifswald hat er sich stets für den Fortgang der Arbeit eingesetzt. Weder die erschwerten Bedingungen durch die große Entfernung zwischen München und Greifswald noch seine Funktion als Chefarzt der chirurgischen Klinik und seine dementsprechend sehr knapp bemessene Freizeit ließen die Durchführung der vorliegenden Dissertation scheitern. Dafür - nicht zuletzt auch bei seiner Familie - möchte ich mich herzlich bedanken.

Nicht minder Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer. Er hat nicht nur die Tierställe, Versuchstiere sowie den notwendigen Arbeitsplatz mit sämtlichen Materialien für die Operationen und ex vivo Untersuchungen bereitgestellt, sondern auch entscheidend an der Versuchsplanung und -durchführung mitgewirkt. Nur durch sein großes persönliches Engagement und seinen aufmunternden Zuspruch wurde die Erstellung dieser Arbeit erst möglich.

Für die Einführung in die mikrochirurgischen Arbeitsweisen bin ich Dr. med. Stefan Maier zu großem Dank verpflichtet, natürlich auch für seine stete Hilfsbereitschaft und hervorragende Unterstützung.

Stets kollegial und freundschaftlich war die Zusammenarbeit mit meinen Mitdoktoranden Volker Aßfalk, Martin Veit, Eduard Matevossian und vor allem Tobias Träger. Sehr dankbar bin ich Christine Tertilt für die Durchführung zahlreicher Untersuchungen am Durchflusszytometer, deren Ergebnisse Eingang in diese Arbeit fanden. Ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Klaus Gerauer, der neben seinen eigenen Versuchsvorhaben die Betreuung dieses Projektes mit übernommen hat. Ein Großteil am Entstehen dieser Arbeit geht auf seine freundschaftliche und zugleich fachliche Zusammenarbeit zurück.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Meinen beiden Brüdern für den stets aufmunternden Zuspruch, meinen Eltern für die finanzielle und vor allem moralische Unterstützung und ihr immer vorhandenes Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Mein letzter, umso herzlicher Dank gilt Katrin. Sie hat mich in den vergangenen vier Jahren in den schweren Phasen dieser Arbeit immer wieder ermutigt und mir die notwendige Kraft und Freude zu deren Weiterführung zurückgegeben. Zum glücklichsten Menschen machte sie mich aber durch die Geburt unseres Sohnes.