

Aus der Abteilung
Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der
Medizinischen Hochschule Hannover

**Induktion von Transplantatlangzeitüberleben in
lymphopenen T-Zell-rekonstituierten Empfängern
im heterotopen Herztransplantationsmodell in der
Maus**



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
an der Medizinischen Hochschule Hannover

Vorgelegt von Daniel Wemhoff
aus Georgsmarienhütte
Hannover 2008

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 10.12.2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident:	Prof. Dr. med. Dieter Bitter-Suermann
Betreuer der Arbeit:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Matthias W. Hoffmann
Referent:	Prof. Dr. med. Oliver Bock
Korreferent:	PD Dr. med. André Simon
Tag der mündlichen Prüfung:	10. 12. 2009
Promotionsausschussmitglieder:	Prof. Dr. med. Reinhold Ernst Schmidt Prof. Dr. med. Anke Schwarz Prof. Dr. med. Bettina Wedi

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	5
1.1. Homing und Priming von Lymphozyten.....	6
1.2. Überleben und Proliferation von T-Zellen	13
1.3. Mechanismen der Toleranzinduktion	17
1.4. Sphingosine-1-Phosphat und der Agonist FTY720.....	19
1.5. Fragestellung	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1. Mausstämme.....	22
2.2. T-Zellseparation.....	24
2.3. CFSE-Markierung	27
2.4. Operative Eingriffe	28
2.4.1. Tierschutzrechtliche Bestimmungen.....	28
2.4.2. Tierhaltung	28
2.4.3. Orale Medikamentenapplikation	28
2.4.4. Intraperitoneale Injektion	29
2.4.5. Intravenöse Injektion	29
2.4.6. Costimulationsblockade.....	29
2.4.7. Donorspezifische Transfusion	29
2.4.8. Narkose, Nachbehandlung.....	29
2.4.9. Herztransplantation.....	30
2.4.10. Organentnahme.....	30
2.4.11. Operation des Empfängers.....	31
2.4.12. Beurteilung der Funktion des Transplantates	32
2.4.13. Blutentnahme.....	33
2.4.14. Tötung und Organentnahme zwecks T-Zellseparation und Organanalyse	33
2.5. Durchflusszytometrie.....	34
3. Ergebnisse	36
3.1. Reinheit der negativen Separation	36
3.2. CFSE-Labeling.....	37
3.3. Untersuchungen zur Proliferationsanalyse.....	38
3.4. T-Zell-Konzentration.....	39

3.5. FTY720-Einfluß in T-Zell-rekonstituierten RAG2 ^{-/-} -Mäusen nach Toleranzinduktionsprotokoll	41
3.6. Proliferationsverhalten von Lymphozyten in RAG2 ^{-/-} -Empfängern.....	43
3.7. Toleranzinduktion in OT-1xRAG2 ^{-/-} -Empfängern	50
3.8. Proliferationsverhalten von Lymphozyten in OT-1xRAG2 ^{-/-} -Empfängern.....	52
3.9. Proliferationsverhalten von Lymphozyten in OT-1xRAG2 ^{-/-} -Empfängern nach Herztransplantation.....	59
3.10. FTY720-Einfluß in CCR7 ^{-/-} -Mäusen nach Toleranzinduktionsprotokoll.....	66
4. Diskussion	68
4.1. T-Zell-Konzentration.....	69
4.2. FTY720-Einfluß in T-Zell-rekonstituierten RAG2 ^{-/-} -Mäusen nach Toleranzinduktionsprotokoll	71
4.3. Toleranzinduktion in OT-1xRAG2 ^{-/-} -Empfängern	77
4.4. FTY720-Einfluss in CCR7 ^{-/-} -Mäusen	81
5. Zusammenfassung.....	83
6. Literatur	84
7. Anhang.....	94
7.1. Tabelle der Verbrauchsmaterialien, Pharmaka und Geräte	94
7.2. Ansätze gebräuchlicher Lösungen.....	97
7.3. Abkürzungsverzeichnis	98
8. Danksagung	100
9. Lebenslauf.....	101
10. Veröffentlichungen	102
10.1. Wissenschaftliche Vorträge.....	102
10.2. Poster.....	102
11. Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 PromO	103

1. Einführung

Die Organtransplantation ist Mittel der Wahl zur Therapie des irreversiblen Organversagens und spielt eine zunehmende Rolle nicht nur als letztmögliche, sondern auch ebenso als elektive Operation.

Dabei haben verbesserte Operationstechniken, Organkonservierungen und immunsuppressive Medikamente das Transplantatüberleben stetig gebessert. Dennoch kann mit den herkömmlichen Regimen nicht dauerhaft verhindert werden, dass allogene Transplantate durch das Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt und in der Folge angegriffen werden. Obwohl die eingesetzten immunsuppressiven Medikamente suffizient das Immunsystem unterdrücken und somit das Transplantatüberleben verlängern, haben sie doch teilweise erhebliche Nebenwirkungen. So steigt das Risiko, an Infektionen zu erkranken oder maligne Entartungen zu erleiden, ferner kann es zu Zuständen der Lymphopenie kommen. Zudem führt häufig die chronische Dysfunktion zu einem späteren Verlust des Organs [1-3]. Eine Möglichkeit, auf Immunsuppression zu verzichten und die chronische Dysfunktion zu verhindern, ist, die körpereigene Abwehr gegenüber Transplantaten spezifisch zu unterdrücken. Dieser Zustand wird als Toleranz bezeichnet. Die gezielte Toleranzinduktion ist daher ein wichtiges Ziel der transplantationsimmunologischen Forschung [4]. Dabei gibt es verschiedenste Mechanismen und Hypothesen, Toleranz zu induzieren. Ein Konzept zur Induktion peripherer gewebespezifischer Toleranz besteht darin, costimulatorische Signale, wie sie bei der Interaktion von Lymphozyten mit dendritischen Zellen vorkommen, gezielt zu blockieren und damit die Aktivierung alloreaktiver Lymphozyten zu verhindern.

Um dieses Konzept wissenschaftlich zu untersuchen, wurde die Maus als Versuchsmodell gewählt. Im Mausmodell stehen zahlreiche transgene und knock-out-Stämme zur Verfügung, mit deren Hilfe sich die Auswirkung eines bestimmten Moleküls auf das Transplantatüberleben untersuchen lassen. Das primär vaskularisierte Modell der heterotopen Herztransplantation wurde ausgewählt, da es der klinischen Situation mit in der Regel primär vaskularisierten Transplantaten gleicht.

1.1. Homing und Priming von Lymphozyten

Die schädigenden Effekte auf transplantierte Organe werden im Wesentlichen durch das adaptive Immunsystem vermittelt. Die zugehörigen Zellen, vor allem B- und T-Zellen, müssen dazu aktiviert werden - ein Vorgang den man „Priming“ nennt. Dies geschieht in den sekundären lymphatischen Organen, wie Lymphknoten und Milz. Naive Lymphozyten zirkulieren vor ihrer Aktivierung ständig zwischen Blutsystem einerseits und lymphatischen Organen andererseits. Als „Homing“ bezeichnet man dabei den Eintritt der Lymphozyten vom Blutsystem in die lymphatischen Organe.

Die Lymphknotenarchitektur

Betrachtet man den anatomischen Aufbau von Lymphknoten, so können zwei Hauptregionen unterschieden werden: der Cortex und die Medulla. Die Medulla ist ein Labyrinth aus lymphdrainierenden Sinusoiden. Hier finden sich viele Plasmazellen, aber auch Makrophagen und Gedächtnis-T-Zellen. Der Cortex wird weiterhin unterteilt in den Paracortex (T-Zell-Zone) und die mehr oberflächlich liegenden B-Zell-Zonen, die zunächst als Primärfollikel, später nach Antigenkontakt als Sekundärfollikel bezeichnet werden und ein so genanntes Keimzentrum enthalten. In den Follikeln findet dabei die humorale Immunantwort statt. Dagegen treten in den T-Zell-Zonen, auch als parakortikale Bereiche bezeichnet, die zirkulierenden Lymphozyten in die Lymphknoten ein. Die T-Zellen kommen hier mit den antigenpräsentierenden Zellen (APC), insbesondere mit den dendritischen Zellen (DC), in Kontakt. Im Zentrum eines parakortikalen Bereichs befindet sich eine Vene mit speziellem hohem Endothel, die sog. „Hochendotheliale Vene“ (HEV). Dieses spezielle Blutgefäß wird - mit Ausnahme der Milz - nur in den sekundären lymphatischen Organen gefunden und dient den Lymphozyten, um in diese Organe zu gelangen [5].

Die Milzarchitektur

In der Milz lässt sich makroskopisch die rote Pulpa, in der Erythrozyten abgebaut werden, von der weißen lymphatischen Pulpa unterscheiden. In jedem Bereich der weißen Pulpa fließt das Blut, das Lymphozyten und Antigen transportiert, von einer trabekulären Arterie in eine zentrale Arteriole. Zellen und Antigen gelangen in einen Randsinus und anschließend in eine trabekuläre Vene. Der Randsinus ist von einer Hülle aus Lymphozyten umgeben. Innerhalb des Randsinus liegt um die Zentralarteriole herum die PALS-Region (periarteriolar lymphoid sheath), die aus T-Zellen besteht. Die Follikel bestehen vor allem aus B-Zellen; in den

Sekundärfollikeln befindet sich auch hier ein Keimzentrum, das von einer B-Zellkorona umgeben ist [6, 7].

Das Homing der Lymphozyten in die Lymphknoten

Um über die HEV in die Lymphknoten zu gelangen, ist eine Kaskade von mehreren Adhäsions- und Signalvorgängen notwendig. Zunächst binden die Leukozyten über das Adhäsionsmolekül L-Selectin (CD62L) an PNAD (peripheral node addressin), das von den Endothelzellen exprimiert wird. Alternativ findet man v.a. in den mesenterialen Lymphknoten eine Interaktion über endotheliales MadCAM1 und seinen Ligand $\alpha_4\beta_7$ Integrin auf den Leukozyten. Diese relativ schwachen Bindungen führen zu einem „Entlangrollen“ der Lymphozyten an der Gefäßwand [5]. Als nächstes erfolgt eine Mediator gesteuerte Aktivierungsphase (Integrin-Aktivierung): So genannte CC-Chemokine, v.a. CCL21 (SLC, TCA4, exodus 2 oder 6Ckine) werden konstitutiv von den Endothelzellen der HEV exprimiert und binden an den CC-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) der Leukozyten, einen G-Protein gekoppelten Rezeptor [8]. Ein zweiter CCR7-Agonist, CCL19 (Epstein-Barr-Virus-induce gene 1 ligand chemokine, ELC, MIP3 β), wird von dem Endothel der Lymphgefäße und den interstitiellen Zellen der Lymphknoten, aber nicht von hochendothelialen Venen gebildet. Dennoch kann es in das Lumen der hochendothelialen Venen transportiert werden und dort eine Integrin-Aktivierung induzieren. Dabei wird die rasche Expression von Leukocyte function-associated antigen 1 (LFA1; CD11a-CD18) hervorgerufen. LFA1 bindet nun fest an das Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) und wahrscheinlich auch ICAM2 der Endothelzellen, so dass es zur festen Adhäsion kommt. Als letzter Schritt folgt nun die Diapedese und damit der Eintritt in das Parenchym der Lymphknoten. Neben diesen CCR7 vermittelten Mechanismus scheinen noch andere Nebenwege zu existieren, die es v.a. B-Zellen erlauben in die Lymphknoten zu gelangen. So induziert CXCL12 (stromal cell-derived factor1 α ; SDF1 α) über seinen Liganden CXCR4 die Integrin-Aktivierung. Aber auch T-Zellen ist es beispielsweise in C57BL/6-Mäusen möglich, über die CXCL12-CXCR4-Interaktion Integrine zu bilden und so in die Lymphknoten zu gelangen. Sowohl die CCR7 vermittelte Aktivierung, als auch die CXCR4 vermittelte Aktivierung wird durch Sphingosin-1-Phosphat (S1P) verstärkt, wobei jedoch die Anwesenheit von S1P nicht zwangsläufig notwendig ist [9].

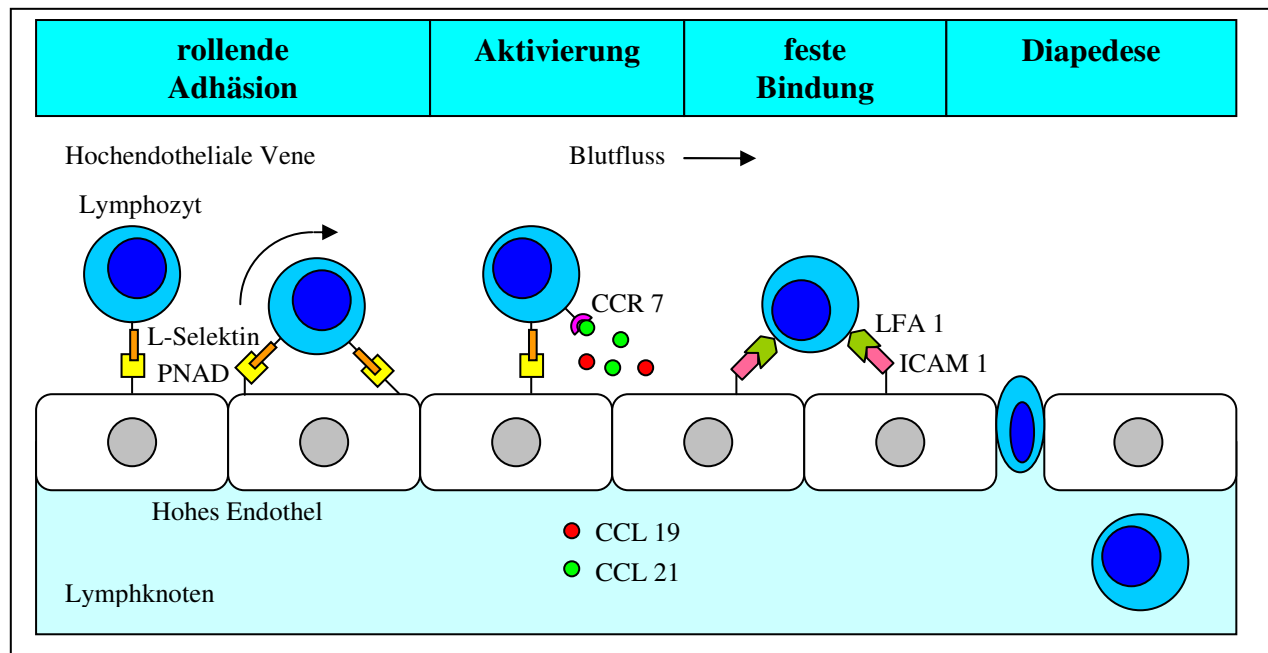


Abbildung 1: Homingprozess der Lymphozyten in die Lymphknoten: Lymphozyten binden schwach über L-Selektin an PNAD der Endothelzellen der HEV's. Dies führt zu einem „Entlangrollen“ der Lymphozyten. Es folgt eine chemokinvermittelte (CCL 19 und CCL 21) Aktivierung, die zur Expression von LFA 1 führt. Hierüber binden die Leukozyten fest an ICAM 1. Nun kommt es zur Diapedese und zum Eintritt in den Lymphknoten.

Das Homing der Lymphozyten in die Milz

Um aus dem Blut in die weiße Pulpa zu gelangen, spielen auch beim Homing in der Milz Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Von den exprimierten Integrinen sind vor allem LFA-1 und $\alpha_4\beta_1$ Integrin von Bedeutung. Andererseits werden in der marginalen Zone entsprechende Liganden gebildet, so vor allem ICAM-1 für LFA-1 und VCAM-1 und MadCAM-1 für $\alpha_4\beta_7$ Integrin. Führend scheint hier in erster Linie die Interaktion LFA-1/ICAM-1 zu sein, etwas schwächer wirkt sich die Interaktion $\alpha_4\beta_7$ -Integrin/VCAM-1 aus. Ferner kann auch Fibronectin als Ligand in Frage kommen, jedoch nur, wenn es in hoher Dichte exprimiert wird. Im Gegensatz zu den Lymphknoten scheinen Selektine keine Bedeutung für das Homing in die Milz zu besitzen. Nach der Integrin-Liganden-Interaktion erfolgt die Passage der Lymphozyten über die Endothelzellschicht der marginalen Sinusoide. Damit die Lymphozyten in ihr entsprechendes Kompartiment gelangen, erfolgt nun die Steuerung über CCR7 und CXCR5 [10].

Die Migration der dendritischen Zellen

Damit Antigen, beispielsweise Mikroorganismen, tote Zellen, Zellbestandteile oder auch Antigene aus transplantierten Geweben, aus der Peripherie den T-Zellen in den Lymphknoten

präsentiert werden können, gibt es zwei Möglichkeiten, wie diese in die Lymphknoten gelangen: Die erste besteht darin, dass das Antigen durch die Lymphflüssigkeit in die Lymphknoten transportiert wird und dort von unreifen dendritischen Zellen (DC) aufgenommen und prozessiert wird. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das Antigen direkt im peripheren Gewebe von dort ansässigen unreifen dendritischen Zellen, z.B. den Langerhanszellen in der Haut, aufgenommen wird. Anschließend prozessieren sie das Antigen und transportieren es zu den drainierenden Lymphknoten. Während der Verarbeitung des Antigens reifen die dendritischen Zellen zu potenten antigenpräsentierenden Zellen (APC). Dabei verlieren sie ihre starken phagozytischen und makropinocytischen Eigenschaften sowie Rezeptoren für inflammatorische Chemokine. Gleichzeitig wird aber die Expression von Rezeptoren für lymphatische Chemokine gesteigert, besonders CCR7, CXCR4 und CCR4. Weiterhin werden jetzt auch große Mengen von MHC I bzw. MHC II, B7.1, B7.2 sowie vermehrt Adhäsionsmolekülen wie ICAM1, ICAM2, LFA1 und LFA3 gebildet [5]. Diese reifen dendritischen Zellen können nun über die Lymphgefäße die entsprechenden Lymphknoten erreichen. Wie bei den T-Zellen ist das Eintreten in die Lymphgefäße ein CCR7 gesteuerter Schritt, da das Endothel der Lymphgefäße CCL21 produziert. CCR7 und seine Liganden sind auch in das schnelle Migrationsverhalten in die T-Zell-Zonen involviert [11]. Ein weiterer wichtiger Migrationsmechanismus wird durch S1P und seinen Rezeptoren gesteuert (s.u.).

Die Antigenpräsentation: Interaktion von antigenpräsentierenden Zellen mit T-Zellen

Nachdem T-Zellen über die hochendothelialen Venen und die dendritischen Zellen über die Lymphgefäße die T-Zell-Zone im Lymphknoten erreicht haben - gesteuert werden beide Zellarten über die Chemokine CCL19 und 21, die von Stromazellen gebildet werden - bewegen sie sich zufällig durch dieses Areal. Dabei präsentieren die dendritischen Zellen ihr aufgenommenes Antigen zahlreichen T-Zellen (bis zu 500 pro Stunde). Um die Interaktion der Zellen zu fokussieren, sezernieren dendritische Zellen die chemotaktischen Chemokine CCL17 (TARC) und CCL22 (MDC). Aktivierte T-Zellen tragen den entsprechenden Rezeptor CCR4 [8]. Um letztendlich in direkten Kontakt zueinander zu treten, binden antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen über diverse Adhäsionsmoleküle. Auf T-Zellen befinden sich die Oberflächenmoleküle CD2, LFA-1 und ICAM-3, antigenpräsentierende Zellen exprimieren die entsprechenden Liganden LFA-3, ICAM1, ICAM-2 und DC-SIGN [12]. Erkennt eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen, so verstärkt sich die Interaktion, z.B. durch Konformationsänderung von LFA-1 [13, 14].

Interaktion von MHC-Molekül und T-Zell-Rezeptor

Die eigentliche Antigenpräsentation erfolgt über die MHC-Moleküle (major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex) der antigenpräsentierenden Zellen, insbesondere durch die dendritischen Zellen. Im Folgenden kommt es zu einer Interaktion dieses MHC-Antigenkomplexes einerseits und dem T-Zellrezeptor (TCR) andererseits. Des Weiteren exprimieren naive T-Zellen einen Corezeptor, der für die MHC:Antigen-TCR-Bindung unerlässlich ist, nämlich entweder CD4 oder CD8. Dabei interagiert der T-Zellrezeptor der CD8-T-Zellen mit MHC-Molekülen der Klasse I, während der T-Zellrezeptor von CD4-T-Zellen auf MHC der Klasse II gerichtet ist [15, 16]. Zu einer Aktivierung der naiven T-Zelle, dem sog. „Priming“, kommt es aber erst dann, wenn TCR und MHC-Antigenkomplex entsprechend zueinander passen. Dies ist vermutlich nur bei einer von 10^4 bis 10^6 naiven T-Zellen der Fall.

Die Costimulation

Die MHC:Antigen-TCR-Interaktion allein reicht jedoch nicht aus, um eine naive T-Zelle zu einer Effektorzelle zu aktivieren. Vielmehr ist noch ein zweites Signal, ein sog. costimulierendes Signal notwendig [17]. Diese geht dabei von der antigenpräsentierenden Zelle aus, auf der die T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt. Die am besten charakterisierten costimulierenden Moleküle sind die B7-Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Der entsprechende Rezeptor der T-Zellen ist CD28, der zur Immunglobulin-Superfamilie gehört [18]. Neben CD28 dient CTLA-4 (CD152) als weiterer Rezeptor für B7-Moleküle. Dieses Protein ähnelt CD28 sehr stark, wird aber erst auf aktivierten T-Zellen exprimiert und hat eher inhibitorisch modulierende Funktionen [19]. Noch ein drittes, mit CD28 verwandtes Protein wird auf aktivierten T-Zellen induziert: der induzierbare Costimulator ICOS (Inducible Costimulator) kann T-Zell-Antworten verstärken. Er bindet jedoch nicht an B7-Moleküle, sondern an seinen Liganden B7-H2/B7RP-1, der auf aktivierten antigenpräsentierenden Zellen zu finden ist [18, 20]. Ein weiteres Ligandenpaar, welches zur Costimulation beiträgt, ist CD40/CD40L (CD40-Ligand, CD154): CD40 wird von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und T-Zellen bilden den entsprechenden Liganden CD40L. CD40 und CD40L gehören zu den Rezeptoren und Liganden der TNF-Familie (Tumor Nekrose Faktor) [21, 22]. Ein anderes induzierbares Molekülpaar aus der TNF-Familie, das ebenfalls an der Costimulation von T-Zellen beteiligt ist, sind das 4-1BB-Molekül (CD137) der aktivierten T-Zellen, sowie sein Ligand 4-1BBL, der von aktivierten dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen gebildet wird [23, 24].

Nur eine Minderheit der T-Zell-DC-Interaktionen ist langlebig und von Erfolg gekrönt. Hat aber eine T-Zelle eine dendritische Zelle gefunden, die ihr passendes Antigen zu ihrem TCR präsentiert, so muss die T-Zelle entscheiden, ob und in welcher Weise sie darauf reagiert [5]. Aktivierte CD4-T-Zellen durchlaufen eine gesteigerte Expression von CXCR5, parallel eine verminderte Bildung von CCR7. Dies führt dazu, dass sie sich in Richtung der T-Zell-B-Zell-Grenze bewegen, um mit den B-Zellen zu interagieren [8].

Kommt es für die T-Zelle nicht zu einem solchen Schritt, verlässt sie den Lymphknoten nach ca. 12-18 Stunden über das efferente Lymphgefäß und gelangt schließlich über den Ductus thoracicus wieder in den Blutkreislauf, um von dort erneut in lymphatische Organe zu gelangen [8].

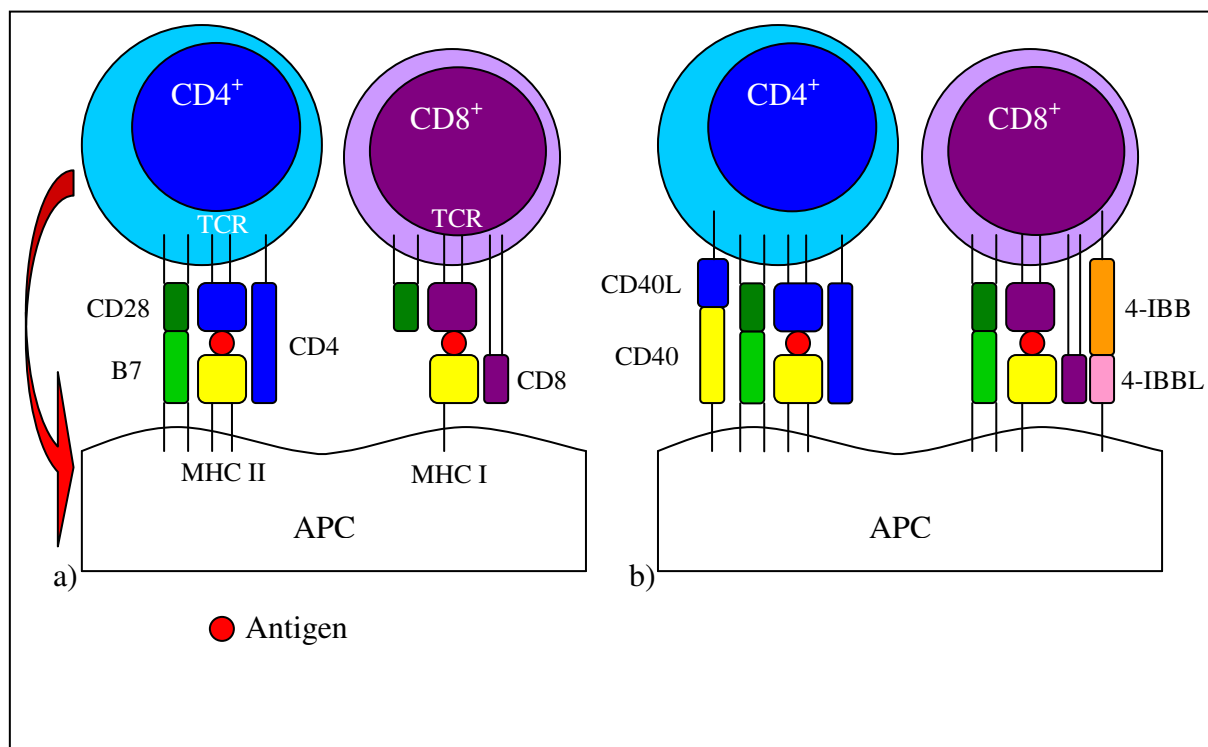


Abbildung 2: Costimulation bei der TCR-MHC-Interaktion: a) APC aktiviert CD4-T-Zelle, diese aktiviert wiederum APC, b) APC exprimiert CD 40 und 4-IBBL, wodurch die CD8-T-Zelle costimuliert wird.

Das Verlassen der Lymphknoten

Um die Lymphknoten zu verlassen, begeben sich die Lymphozyten zu einem Großteil in die sog. kortikalen Sinusoide/Trabekelsinusoide, die wiederum mit den medullären Sinusoiden verbunden sind. Von dort gelangen die Lymphozyten in das efferente Lymphgefäß [8]. In der Milz wandern sie zunächst von der weißen Pulpa zur roten, um von dort ins Blut zu gelangen. Gesteuert wird das Verlassen der sekundären Lymphorgane durch Sphingosin-1-Phosphat. Dieses wird von Stromazellen der Lymphknoten produziert. Naive Lymphozyten exprimieren die entsprechenden Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren, welche G-Protein-gekoppelt sind. Es

existieren fünf Isoformen des Rezeptors (S1P₁ bis S1P₅), wobei Lymphozyten S1P₁ (endothelium differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 (EDG-1)) und S1P₄ (EDG-6) bilden. S1P₁ ist dabei aber wesentlich wichtiger als S1P₄. Werden Lymphozyten hingegen aktiviert, so findet zunächst eine verminderte Expression von S1P₁ um den Faktor 100 statt. Am dritten Tag nach Antigenkontakt ist wieder eine gesteigerte S1P₁-Expression nachweisbar und ein Verlassen der sekundären lymphatischen Organe möglich [25].

1.2. Überleben und Proliferation von T-Zellen

Die Größe des Lymphozytenpools ist von fundamentaler Bedeutung für das adaptive Immunsystem. Auf der einen Seite muss der Pool möglichst umfangreich sein, um Pathogene im Körper zu erkennen und zu eliminieren, auf der anderen Seite bietet der Körper nur begrenzten Platz für all diese Zellen. Unter normalen Umständen wird die Anzahl von Lymphozyten deshalb streng reguliert, so dass die Größe des peripheren Pools stets konstant gehalten wird, es sei denn, der Körper wird einem Pathogen, z.B. einer Infektion oder auch einem Transplantat, ausgesetzt. Dann ist das Immunsystem der Säuger in der Lage antigenspezifische Populationen für die Immunantwort zunächst rapide expandieren und später nach erfolgter Immunantwort schrumpfen zu lassen. Ein Teil der neu gebildeten Immunzellen entwickeln sich dabei zu Memory-Zellen bzw. Gedächtniszellen und bildet so noch lange nach dem Antigenkontakt das immunologische Gedächtnis [26]. Um die Homeostase der naiven T-Zellen zu erhalten, ist aufgrund der relativ langen Lebenszeit der Lymphozyten (Monate in Ratte und Maus, Jahre beim Menschen) in den gefüllten lymphatischen Kompartimenten, v.a. Lymphknoten, Peyersche Platten und Milz, nur eine minimale Teilungsrate notwendig, zumal vor allem in den jüngeren Jahren ständig neue Lymphozyten aus den primären lymphatischen Organen Knochenmark und Thymus nachrücken [26]. Wie andere Zellen sind auch naive T-Zellen auf Überlebenssignale angewiesen. Einerseits wird hierzu Interleukin 7 (IL-7) benötigt [27, 28], andererseits spielt die TCR-MHC-Interaktion (mit Selbstantigenen) eine entscheidende Rolle [29, 30].

Memory-Zellen hingegen unterliegen einer kontinuierlichen so genannten „basalen Proliferation“, einer antigenunabhängigen Zellteilung in vollen lymphatischen Kompartimenten [31]. Das Überleben dieser Zellen und ihre basale Proliferation wird v.a. durch IL-15 vermittelt [28]. Eine TCR-MHC-Interaktion scheint hier keine Bedeutung zu haben [32, 33].

Anders sieht es hingegen in Individuen aus, die sich im Zustand der Lymphopenie befinden. Dieser Zustand der Lymphozytenarmut kann durch Gendefekte in der Lymphozytenentwicklung hervorgerufen werden. Zum einen ist dies beim schweren kombinierten Immundefekt (Severe combined immunodeficiency, SCID) der Fall, bei dem weder Antikörper- noch T-Zell-Antworten ausgelöst werden. Im Allgemeinen besteht ein Mangel an T-Zellen. Ursache ist eine scid-Mutation, die zu einem Defekt bei der Rekombination der Rezeptorgene führt. Zum anderen führt ein Fehlen eines der rekombinationaktivierenden Gene (recombination-activating gene) RAG1 oder RAG2 zu

einer Lymphopenie. Die Gene RAG1 und RAG2 codieren Proteine, die bei der Umordnung (Rearrangement) der Gene für die Immunrezeptoren eine wichtige Rolle spielen. Mäuse, denen eines der Gene RAG1 oder RAG2 fehlt, so genannte RAG1 oder RAG2 knock-out-Mäuse, können keine Immunrezeptoren bilden und besitzen daher keine Lymphozyten. Weiterhin kann aber auch eine sublethale Bestrahlung zum lymphopenen Zustand führen. Eine Lymphopenie lässt sich ferner durch monoklonale depletierende Antikörper, die gegen Lymphozyten gerichtet sind, erreichen.

Transferiert man solchen lymphopenen Empfängern T-Zellen, so kommt es bei diesen zur so genannten „homeostatischen Proliferation“ (HP), „homeostatischen Expansion“ oder „Lymphopenie induzierten Proliferation“ (LIP) [34, 35]. Voraussetzung für diese Art der Proliferation scheinen die „leeren“ lymphatischen Kompartimente von Milz und Lymphknoten zu sein, welche die transferierten T-Zellen vorfinden. Weiterhin ist hier die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor einerseits und den MHC-Molekülen andererseits von Bedeutung, wie es auch für das Überleben der T-Zellen von oberster Priorität ist [34]. Auch Cytokine beeinflussen hier das Verhalten der T-Zellen. Besonders Interleukin 7 (IL-7) besitzt eine Schlüsselstellung bei der homeostatischen Proliferation der naiven T-Zellen. Ferner können auch IL-4, IL-12 und IL-15 die Proliferation verstärken, sie sind aber nicht notwendig. Hingegen scheinen IL-7 und IL-15 bei der homeostatischen Expansion von Memory-T-Zellen gleichwertig zu sein [28].

Während der homeostatischen Proliferation erlangen die zuvor naiven T-Zellen phenotypische und funktionelle Eigenschaften, die denen von Gedächtniszellen ähnlich sind, es fehlt jedoch der Wechsel in die typischen Übergangsstadien. Daher werden diese Zellen von einigen Autoren auch als „Memory-like-Zellen“ beschrieben. Dabei verändert sich das Oberflächenmuster der naiven Zellen (siehe Tabelle1) [26]. Funktionell sind homeostatisch proliferierte CD4-T-Zellen, wie auch „wahre“ Gedächtniszellen in der Lage, auf geringere Antigen Dosen mit einer entsprechenden Immunantwort zu reagieren als naive Zellen. Des Weiteren benötigen Gedächtniszellen und auch T-Zellen nach homeostatischer Proliferation keine Costimulation mittels CD28, wie es für naive Zellen hingegen unerlässlich ist. Schließlich sind homeostatisch proliferierte Zellen wie Gedächtniszellen in der Lage, IL-2 und Interferon γ (IFN- γ) zu bilden [36]. Im Gegensatz zu CD4-T-Zellen ist die Datenlage für CD8-T-Zellen eher uneinheitlich. Zwar nehmen homeostatisch proliferierte CD8-T-Zellen ebenfalls phenotypische Eigenschaften von Gedächtniszellen an [35], in Bezug auf die funktionellen Eigenschaften beschreiben aber einige Autoren, dass homeostatisch proliferierte CD8-T-Zellen ähnliche Eigenschaften besitzen, die denen von naiven CD8-T-Zellen

entsprechen [37]. Andere hingegen berichten genau Gegenteiliges, nämlich dass auch diese Zellen funktionelle Eigenschaften erwerben, die denen von Gedächtniszellen entsprechen [38, 39].

Neben der langsamen homeostatischen Proliferation existiert noch eine weitere Art der Proliferation in lymphopenen Empfängern. Die Arbeitsgruppe um Min *et. al* bezeichnete sie als „spontane Proliferation“. Min konnte beobachten, dass sich die Zellen wesentlich schneller teilen, nämlich mehr als einmal am Tag, wo hingegen homeostatisch proliferierte Zellen sich nur alle 2-4 Tage einmal teilen. Außerdem verläuft die spontane Proliferation unabhängig von IL-7. Schließlich zeigen spontan proliferierte Zellen auch ein etwas anderes Expressionsmuster ihrer Oberflächenmarker [40].

Zur Limitierung der homeostatischen Proliferation gibt es mehrere Theorien: entweder terminiert der direkte T-Zell-T-Zell-Kontakt eine weitere Expansion, oder die Konkurrenz der IL-7-Rezeptoren um IL-7 verhindert weitere Teilungen. Dazu erschweren „volle“ lymphatische Kompartimente den Zugang der T-Zellen zu den antigenpräsentierenden Zellen für die TCR-Selbst-Peptid-MHC-Interaktion und sorgen damit für eine Beendigung der Proliferation [26, 41].

Zellart	Naive T-Zellen	Memory-(like)-T-Zellen (nach HP)	T-Zellen nach SP
CD4 ⁺ T-Zellen	CD44 ^{lo} CD45RB ^{hi}	CD44 ^{hi} CD45RB ^{lo} CD62L ^{hi}	CD44 ^{hi} CD25 ⁺ (nicht alle) CD 62L ^{lo}
CD8 ⁺ T-Zellen	CD44 ^{lo} Ly-6C ^{lo} IL-2Rβ ^{lo}	CD44 ^{hi} Ly-6C ^{hi} IL-2Rβ ^{hi} CD62L ^{hi}	CD44 ^{hi} CD25 ⁺ (nicht alle) CD 62L ^{lo}

Tabelle 1: Differenzierung naiver T-Zellen und Memory-(like)-T-Zellen

anhand von Oberflächenmarkern; HP: homeostatische Proliferation; SP: spontane Proliferation [26, 40]

Nach Transfer von Lymphozyten in lymphopene Empfänger ist nicht nur im Phänotyp der einzelnen Zellen eine Veränderung zu verzeichnen. Auch die Morphologie der sekundären lymphatischen Organe muss sich erst entwickeln. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass fünf Tage nach dem Transfer von $1 \cdot 10^7$ 2C T-Zell-Rezeptor (TCR) transgenen CD8-T-Zellen aus einer Spendermilz Zellen in der Milz der Empfängertiere nachgewiesen werden

konnten, die positiv für CD3, CD8, IL2-R und 2C TCR waren. Am Tag 10 sind weiterhin CD3-Zellen nachweisbar, jedoch sind sie homogen verteilt und die typische Milzarchitektur ist noch nicht zu erkennen. Erst nach 20 Tagen ist die typische Milzarchitektur erkennbar und am Tag 30 sind die typischen Bereiche der CD3-Zellen gut ausgebildet, sowie die entsprechenden Zellen in reichlicher Zahl vorhanden. Die Lymphknoten von T-Zell-rekonstituierten Tieren zeigen ein sehr ähnliches Verhalten [42].

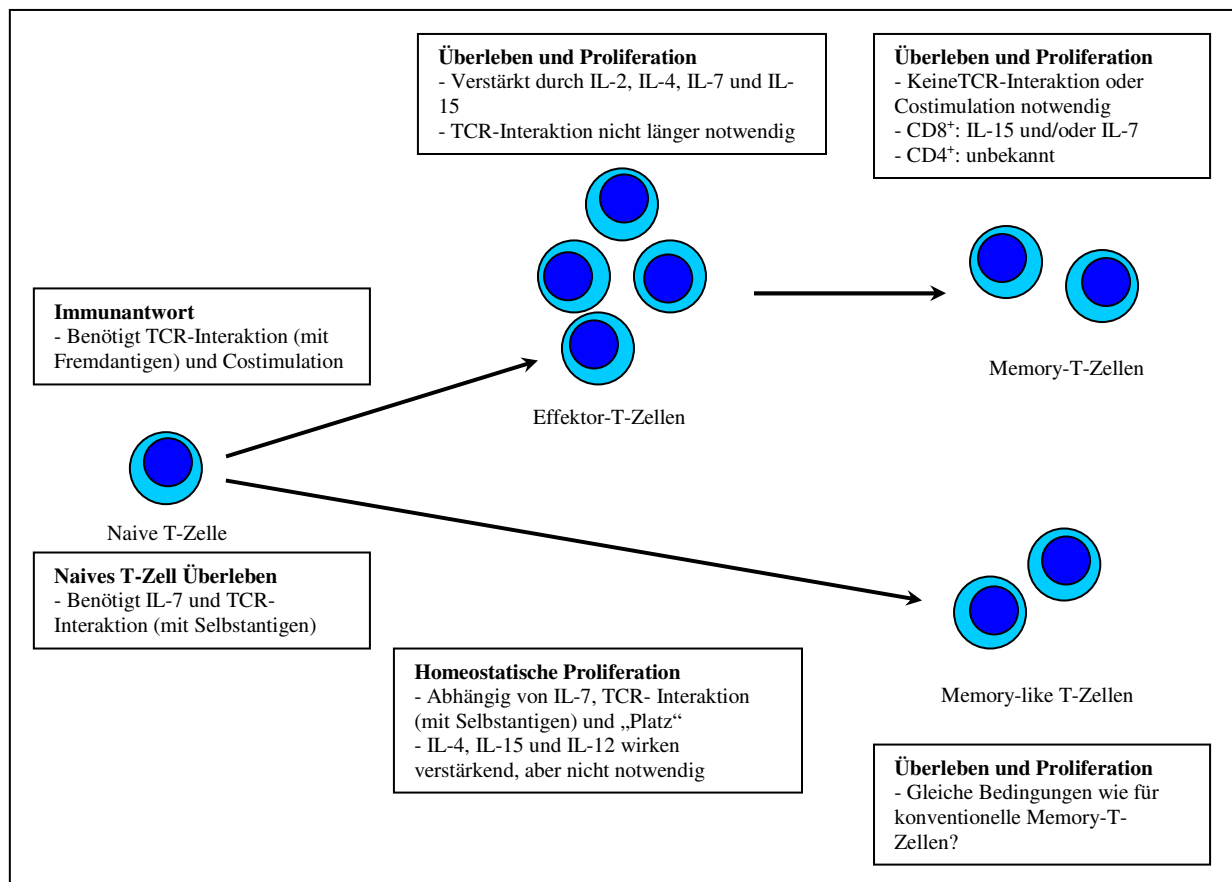


Abbildung 3: Hauptfaktoren, die die Proliferation und das Überleben von naiven Lymphozyten, Effektor- und Memory-Zellen beeinflussen [26].

1.3. Mechanismen der Toleranzinduktion

Das Nichtreagieren des Immunsystems auf eigenes oder fremdes Antigen wird als Toleranz bezeichnet. Eine Selbsttoleranz erwerben T-Zellen während ihrer Reifung im Thymus. Dabei werden Zellen deletiert, die einerseits eine zu starke Affinität (negative Selektion) oder andererseits keine bzw. eine zu schwache Affinität zu Selbst-Antigen entwickelt haben (Ausbleiben der positiven = keine Selektion)[43, 44].

Durch gezielte Manipulationen des Immunsystems ist es im Tiermodell zudem möglich, nach Organtransplantationen eine gegenüber dem Transplantat spezifische körpereigene Abwehr des Immunsystems zu unterdrücken und somit eine spezifische Toleranz zu induzieren. Dabei existieren verschiedene Konzepte, um periphere gewebespezifische Toleranz zu erzeugen. So nutzt man zum einen die Aktivierung von Suppressorzellen, zum anderen die Induktion von Anergie, d.h. die Induktion eines Zustandes der fehlenden Reaktivität auf Antigene. Auch die Deletion von alloreaktiven Spender-T-Zellen oder der programmierte Zelltod (Apoptose) von alloreaktiven Lymphozyten, z.B. durch Expression proapoptotischer Moleküle im Transplantat durch Gentherapie, dient dazu, Transplantattoleranz zu induzieren. [45]. Weiterhin kann auch durch die Applikation von monoklonalen Antikörpern gegen CD2 und CD3 Toleranz induziert werden [46].

Eine weitere Möglichkeit periphere Toleranz zu erzeugen, besteht in der Blockierung costimulatorischer Signale, die unerlässlich für den Prozess der Antigenpräsentation und somit für die Aktivierung der Lymphozyten sind. So kann die spezifische Blockade der CD28:B7-Interaktion mittels CTLA-4-Ig genauso zur Toleranz nach Organtransplantation führen, wie die von 4-HB [47].

Ebenso kann auch durch die Blockade der CD40-CD40L Interaktion dauerhaftes Transplantatüberleben im Nagermodell erzeugt werden, wobei teilweise zusätzlich eine donorspezifische Transfusion (DST) eingesetzt wird: beispielsweise bei Herz- [48], Haut- [49], Inselzell- [50], Nieren- [51], Knochen- [52] oder gar Extremitätentransplantaten [53]. Die Costimulationsblockade kann dabei durch monoklonale Antikörper, die gegen CD40L gerichtet sind (antiCD40L/Anti-CD154/MR-1) erreicht werden. Aber auch in CD40L-knock-out Tieren lässt sich Toleranz erzeugen [54].

Es gibt auch Versuchskonstellationen, bei denen eine Blockade der Costimulation nicht zu einer dauerhaften Protektion der transplantierten Organe führt. So lässt sich durch eine Blockade der CD40-CD40L Interaktion keine Toleranz in Dünndarmtransplantaten im

Mausmodell erreichen [55]. Erst unter zusätzlicher Behandlung mit dem Immunmodulator FTY720 kann ein verlängertes Transplantatüberleben beobachtet werden (s.u.) [56].

Ebenso versagt die Costimulationsblockade zur Toleranzinduktion bei Versuchstieren, in denen es - bedingt durch eine Lymphopenie - zur homeostatischen Proliferation der Lymphozyten kommt. So rekonstituierte die Arbeitsgruppe um Wu lymphopene Empfängertiere mit T-Zellen. Dabei dienten entweder SCID-Tiere als Empfänger, oder B6-WT-Mäuse, bei denen eine antikörpervermittelte T-Zell-Depletion durchgeführt wurde. Anschließend erfolgte jeweils eine Herztransplantation (Spender: BALB/c). Trotz der Applikation von CTLA-4Ig zur Costimulationsblockade und einer parallel durchgeführten donorspezifischen Transfusion konnte keine Toleranzinduktion erreicht werden [57]. Die Ursache der fehlenden Toleranzinduktion liegt offensichtlich darin begründet, dass homeostatisch proliferierte Lymphozyten den Charakter von Memory-Zellen annehmen. Aber gerade Gedächtniszellen scheinen nicht der Toleranzinduktion durch Costimulationsblockade zugänglich zu sein [58, 59].

Diese Tatsache stellt insofern ein fundamentales Problem in der Transplantationsimmunologie dar, als dass viele Transplantatempfänger unter einer immunsuppressiven Therapie als Nebenwirkung lymphopene Phasen mit nachfolgender homeostatischer Proliferation erleben und womöglich dadurch einer späteren potentiellen Toleranzinduktion entgehen. Beispielsweise kann Azathioprin durch Myelosuppression zu lymphopenen Zuständen führen [60]. Aber auch unter dem Einsatz von Antikörpern, wie Alemtuzumab kann es zur Lymphopenie kommen [61]. Ferner führt die Anwendung von Thymoglobulin durch direkte Lymphozytendepletion zur Lymphopenie [62].

Ein weiteres Konzept Toleranz nach einer Organtransplantation zu erzeugen, besteht darin, ein Zusammentreffen von Lymphozyten und dendritischen Zellen erst gar nicht zu ermöglichen, indem beispielsweise der Homingprozess gestört wird. Da der CCR7-Rezeptor wesentlich beim Homing beteiligt ist, stellt er einen potentiellen Angriffspunkt dar, um das Transplantatüberleben zu verlängern. Zwar konnte in $CCR7^{-/-}$ Mäusen ein signifikant verlängertes Transplantatüberleben im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Empfängern beobachtet werden, ein Überleben im Sinne einer Toleranz konnte jedoch nicht erreicht werden [63].

1.4. Sphingosine-1-Phosphat und der Agonist FTY720

Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ist ein Metabolit, welcher von vielen Zelltypen produziert wird, beispielsweise Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen oder Thrombozyten, und der in hoher Konzentration im Serum nachweisbar ist (bis zu 1 μM). Es ist bekannt als ein potenter Lipidmediator für diverse physiologische Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Überleben, Migration, Adhäsion und Zellmorphologie [64, 65]. Auch im Immunsystem konnte gezeigt werden, dass S1P vor allem chemotaktische Funktionen auf verschiedene Zelltypen besitzt, aber auch das Überleben von Lymphozyten verbessert [25, 66-68]. Zudem reguliert S1P bei B- und T-Zellen das Verlassen der Lymphknoten, indem es bei einem der Kontrollpunkte eingreift, welche die Homeostase der Lymphozyten überwachen [25]. S1P übt einen Großteil seiner Effekte durch Bindung an einem der fünf bekannten S1P-Rezeptoren (S1P_{1-5}) aus, welche zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören und via den kleinen G-Proteinen Cdc42, Rac und Rho einen Einfluss auf den Aufbau des Zytoskelettes und damit auf die Morphologie und Beweglichkeit der Zielzellen nehmen. Dabei besteht eine unterschiedliche Affinität von S1P zu den Rezeptorunterformen. Außerdem führen die Rezeptorsubtypen zu unterschiedlichen Effekten [69-72]. So unterstützt etwa eine Bindung von S1P an S1P_1 über den Rac/Cdc42 Signalübertragungsweg die Zellmigration. Ein gegenteiliger Effekt besteht, wenn S1P an S1P_2 bindet, wobei hier eine Aktivierung über Rho erfolgt [73-76]. S1P_1 und S1P_4 sind dabei die prominentesten S1P-Rezeptoren auf Lymphozyten, auf CD8-T-Zellen findet man zudem S1P_5 [67]. Neben den Lymphozyten exprimieren auch reife, jedoch nicht unreife dendritische Zellen S1P-Rezeptoren, wobei hier vor allem S1P_1 und S1P_3 gefunden werden [77].

FTY720 (2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propan-1,3-diolhydrochlorid) ist ein synthetischer Immunmodulator, bei dem es sich um ein strukturelles Analogon von Myriocin handelt, ein Produkt des Ascomyceten *Iscaria sinclairii* [78, 79]. Es reduziert die Zahl der im Blut zirkulierenden Lymphozyten, insbesondere der T-Zellen, indem es den Aufenthalt in den sekundären lymphatischen Organen, vor allem in den Lymphknoten und Peyerschen Platten fördert bzw. das Verlassen eben dieser verhindert [80]. Dabei kommt es jedoch nicht zu einer generalisierten Immunsuppression, welche u. a. systemische Infektionen zur Folge hat [81, 82]. Der Wirkmechanismus von FTY720 besteht darin, dass es intrazellulär von der Sphingosin-Kinase zum aktiven Metaboliten phosphoryliert wird (P-FTY720). Dadurch stellt es nun ein strukturelles Homolog zu S1P dar und kann an drei der fünf bekannten S1P-Rezeptoren binden, nämlich an S1P_1 , S1P_4 , S1P_5 . Vermutlich fördert FTY720 so die

Internalisation und nachfolgend den Abbau der Sphingosinrezeptoren. Das hat zur Folge, dass der natürliche Ligand S1P nicht mehr wirken kann [83].

FTY720 hindert aber nicht nur die Lymphozyten daran, die sekundären lymphatischen Organe zu verlassen. Es fördert zudem auch den Homingprozess in peripheren und mesenterialen Lymphknoten, sowie auch in den Peyerschen Platten. Somit besteht für Lymphozyten mittels FTY720 ein alternativer G-Protein-gekoppelter Mechanismus, um lymphatisches Gewebe über hochendotheliale Venen zu betreten, der unabhängig von dem klassischen Mechanismus über CCR7 und seinen Liganden CCL19 und CCL21 zu sein scheint [84].

Einen völlig gegenteiligen Effekt übt FTY720 offensichtlich auf dendritische Zellen aus: hier verstärkt FTY720 die Retention der dendritischen Zellen in der Zirkulation, assoziiert mit einer verminderten Expression verschiedener Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, die für die endotheliale Adhäsion in den hochendothelialen Venen und für die Transmigration wichtig sind [85].

Diese immunmodulierenden Effekte von FTY720 können zur Abstoßungsprotektion von Organtransplantaten genutzt werden. In verschiedenen Nager- und Primatenmodellen konnte so durch die Applikation von FTY720 das Transplantatüberleben von Herz [86, 87], Leber [88], Niere [89, 90], Dünndarm [91], Haut aber auch Inselzellen [92] erheblich verlängert werden. Ebenso konnte es erfolgreich in klinischen Tests eingesetzt werden [93].

Obwohl FTY720 das Überleben von Dünndarmtransplantaten im Rattenmodell verbessert [91], schützt FTY720 alleine nicht vor einer Abstoßung von diesen Transplantaten im Mausmodell. Jedoch verhindert FTY720 in Kombination mit einer Costimulationsblockade mittels anti-CD40L (MR-1) effektiv eine Abstoßung von Dünndarmtransplantaten, indem die Lymphozyteninfiltration, insbesondere die Infiltration durch CD8-T-Zellen, in das Transplantat gehemmt wird [56].

1.5. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeiten der Toleranzinduktion in T-Zell-rekonstituierten Empfängern zu untersuchen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Toleranzinduktion mittels Costimulationsblockade möglich ist, wenn die homeostatische Proliferation, welche ansonsten ein Hindernis für die Toleranzinduktion darstellt, unterdrückt wird.

Im Einzelnen standen folgende Fragen im Mittelpunkt:

1. Wie viele T-Zellen müssen RAG2^{-/-}-Mäusen injiziert werden, damit sie allogene Herztransplantate in einem reproduzierbaren Zeitfenster abstoßen, welches zudem möglichst dem von Wildtypempfängern gleichkommt?
2. Kann FTY720 in Kombination mit einer Costimulationsblockade und donorspezifischer Transfusion in lymphopenen T-Zell-rekonstituierten RAG2^{-/-}-Mäusen nach heterotoper allogener Herztransplantation Toleranz induzieren?
3. Ist eine Toleranzinduktion mittels Costimulationsblockade und donorspezifischer Transfusion in T-Zell-rekonstituierte OT-1*RAG2^{-/-}-Mäusen möglich?
4. Welches Proliferationsverhalten zeigen transferierte T-Zellen in lymphopenen Empfängern unter Behandlung mit FTY720 bzw. in OT-1*RAG2^{-/-}-Tieren?
5. Kann FTY720 in Kombination mit einer Costimulationsblockade in CCR7^{-/-}-Mäusen nach heterogener allogener Herztransplantation Toleranz induzieren?

Für die Experimente wurde ein T-Zelltransfer durchgeführt, nachdem entsprechende T-Zellen aus Lymphknoten und Milz von Spendertieren isoliert wurden. Außerdem wurde das vaskularisierte Herztransplantationsmodell verwendet. Als Parameter wurden einerseits die jeweilige Transplantatfunktion und die Überlebenszeit der Transplantate herangezogen, andererseits wurden Analysen der Lymphozyten mit der Durchflusszytometrie durchgeführt.

Sowohl für die eigenen Untersuchungen, aber auch für weiterführende zukünftige Experimente wurde ein Modell etabliert, in dem es nach T-Zell-Transfer nicht zu einer homeostatischen Proliferation kommt und damit die gezielte Analyse einzelner Zell-Subpopulationen ermöglicht wird.

2. Material und Methoden

2.1. Mäusestämme

Stamm	H-2 Lokus	Eigenschaften
C57BL/6 (B6)	H-2 ^b	Wildtyp
C57BL/6 Ly5.1	H-2 ^b	Wildtyp
B6.129S2-Rag2<tm1Fwa> (RAG2 ^{-/-})	H-2 ^b	knock out für RAG2, keine Bildung von Lymphozyten
OT-1	H-2 ^b	TCR nur gegen Ovalbumin gerichtet
OT-1xRAG2 ^{-/-}	H-2 ^b	TCR nur gegen Ovalbumin gerichtet
CCR7 ^{-/-}	H-2 ^b	knock out für CCR7-Rezeptor
BALB/c	H-2 ^d	Wildtyp

Tabelle 2: Mäusestämme

Alle verwendeten Mäusestämme wurden im Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. H.-J. Hederich gehalten und gezüchtet (siehe 2.4.2. Tierhaltung).

Bei den BALB/c-Mäusen handelt es sich um Inzuchtstämme mit dem genetischen Hintergrund H-2^d. Sie wurden ausschließlich als Spender für die Herzen und zur Gewinnung der donorspezifischen Transfusion verwendet.

Alle nachfolgend genannten Wildtypstämme, Knock-out-Stämme und transgenen Stämme besitzen den genetischen Hintergrund H-2^b.

Bei den RAG2^{-/-}-Mäusen handelt es sich um Inzuchtstämme, welche auf Grund des fehlenden rekombinationsaktivierenden Gens 2 (RAG2) keine Lymphozyten bilden können. Somit sind die lymphatischen Kompartimente als anatomisch „leer“ anzusehen. Diese Tiere haben also eine Lymphopenie in maximaler Ausprägung.

OT-1-Mäuse sind transgene Inzuchtstämme, deren überwiegende T-Zellen (CD8-T-Zellen) monoklonale T-Zell-Rezeptoren gegen Ovalbumin exprimieren. Daneben werden aber auch polyklonale T-Zellen gebildet. Um Letzteres zu verhindern, wurden diese Tiere mit RAG2^{-/-}-Tieren gekreuzt. Diese Tiere besitzen nur noch CD8-T-Zellen mit gegen Ovalbumin gerichteten TCR und damit - im Vergleich zu RAG2^{-/-}-Mäusen - „volle“ lymphatische

Kompartimente, ohne aber eine Immunantwort auslösen zu können. Sie sind als „funktionell“ lymphopen zu betrachten.

CCR7^{-/-}-Mäuse sind nicht in der Lage, den zum Homingprozess notwendigen Chemokinrezeptor CCR7 zu bilden.

Der B6-Wildtyp besitzt auf seinen Lymphozyten das Epitop Ly 5.2. Daneben existieren B6-Mäuse, die stattdessen das Epitop Ly5.1 exprimieren. Basierend auf diesem Unterschied können transferierte Lymphozyten von empfangereigenen Lymphozyten differenziert werden, beispielsweise in Untersuchungen mit der Durchflusszytometrie.

2.2. T-Zellseparation

Um die Versuchstiere mit T-Zellen zu rekonstituieren, wurden diese aus Milz und Lymphknoten gewonnen. Dabei wurde das Prinzip der negativen Separation angewandt.

Bei der negativen Zellseparation zur Gewinnung von T-Zellen aus einer homogenen Zellsuspension werden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörpermix versetzt, der gegen Nicht-T-Zellen (B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen und Granulozyten) gerichtet ist. Ein Sekundärantikörper, der einen magnetischen Partikel trägt, bindet nun an die Primärantikörper. In einem Magnetfeld können nun die so markierten Zellen von den Zielzellen getrennt werden. Die unberührten T-Zellen können jetzt weiterverwendet werden (siehe Abbildung 4).

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank (Lamin-Air, Heraeus, Hanau), zudem wurden die Lösungen und Zellsuspensionen durch Eis kühl gehalten.

Nachdem Milz und Lymphknoten aus Spendertieren entnommen wurden, wurden die Organe durch ein Nylonnetz (Gitterabstand 70 µm; NeoLab, Heidelberg) mittels eines Spritzenkolbens (5 ml Spritze; Braun, Melsungen) unter gleichzeitigem Hinzufügen von insgesamt 10 ml Pufferlösung (PBS + 0,1%BSA) gedrückt, zerkleinert und homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation (1000/Min., 10 Min., 4°C). Nun wurden die Erythrozyten mittels eines entsprechenden Puffers lysiert (Erylysepuffer, AG Hoffmann). Anschließend wurden die verbleibenden Zellen zweimal gewaschen und zentrifugiert. Jetzt erfolgte für 30 Minuten die Inkubation der Zellsuspension mit den Primärantikörpern (MAC-1/anti-CD11b, anti-CD16, anti-CD45R/B220) bei 4°C. Um eine Aggregation der Zellen zu verhindern, wurde die Zellsuspension dazu kontinuierlich durchmischt (Jürgens, Hannover). Nach einem erneuten Waschgang folgte dann die Inkubation mit Dynabeads® Sheep anti-Rat IgG (DynaL Biotech) als Sekundärantikörper, ebenfalls für weitere 30 Minuten und unter kontinuierlichem Mischen. Zuvor mussten die Dynabeads® Sheep anti-Rat IgG einmal gewaschen werden: dazu wurden die Beads auf das doppelte Volumen aufgefüllt und für zwei Minuten in ein Magnetfeld gestellt (DynaL MPC, DynaL Biotech). Anschließend wurde der Überstand abgossen und die Beads mit PBS + 0,1%BSA in dem ursprünglichen Volumen gelöst. Nach der halbstündigen Inkubationsphase wurde die Zellsuspension nun für zwei Minuten in ein Magnetfeld gestellt und der Überstand, der die T-Zellen enthielt, abpipettiert und in einem separaten Röhrchen gesammelt [94]. Schließlich wurden die so gewonnenen Zellen noch einmal gewaschen und gezählt. Zudem wurden noch Zellen entnommen, um den Reinheitsgrad der

Separation durchflusszytometrisch zu bestimmen. Letztendlich wurden die Zellen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/0,2 ml in PBS gelöst, um sie dann intravenös applizieren zu können.

Um die Reinheit der T-Zell-Separation zu ermitteln, wurden während der T-Zellseparation zu folgenden Zeiten je drei Proben entnommen: nachdem die Zellen von Milz und Lymphknoten homogenisiert wurden, nach der Inkubation mit den Primärantikörpern und schließlich nach der Zellseparation aus der negativen Fraktion. Dabei lag die zu entnehmende Zellzahl bei $5 \cdot 10^5$ Zellen. Dieses wurde zuvor mikroskopisch bestimmt.

Name	Klon	Spezifität	Bezugsquelle	Verdünnung	Referenz
CD11b	MAC-1	mCD11b	AG Hoffmann	1:2000	
CD16	2.4G2	mCD16	AG Hoffmann	1:1000	
CD45R	B220	mCD45R	AG Hoffmann	1:500	
Dynabeads®		Sheep anti-Rat	Dynal Biotech	$50 \mu\text{l} / 1 \cdot 10^7$ Zellen	Dynal Biotech

Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper zur negativen T-Zellseparation

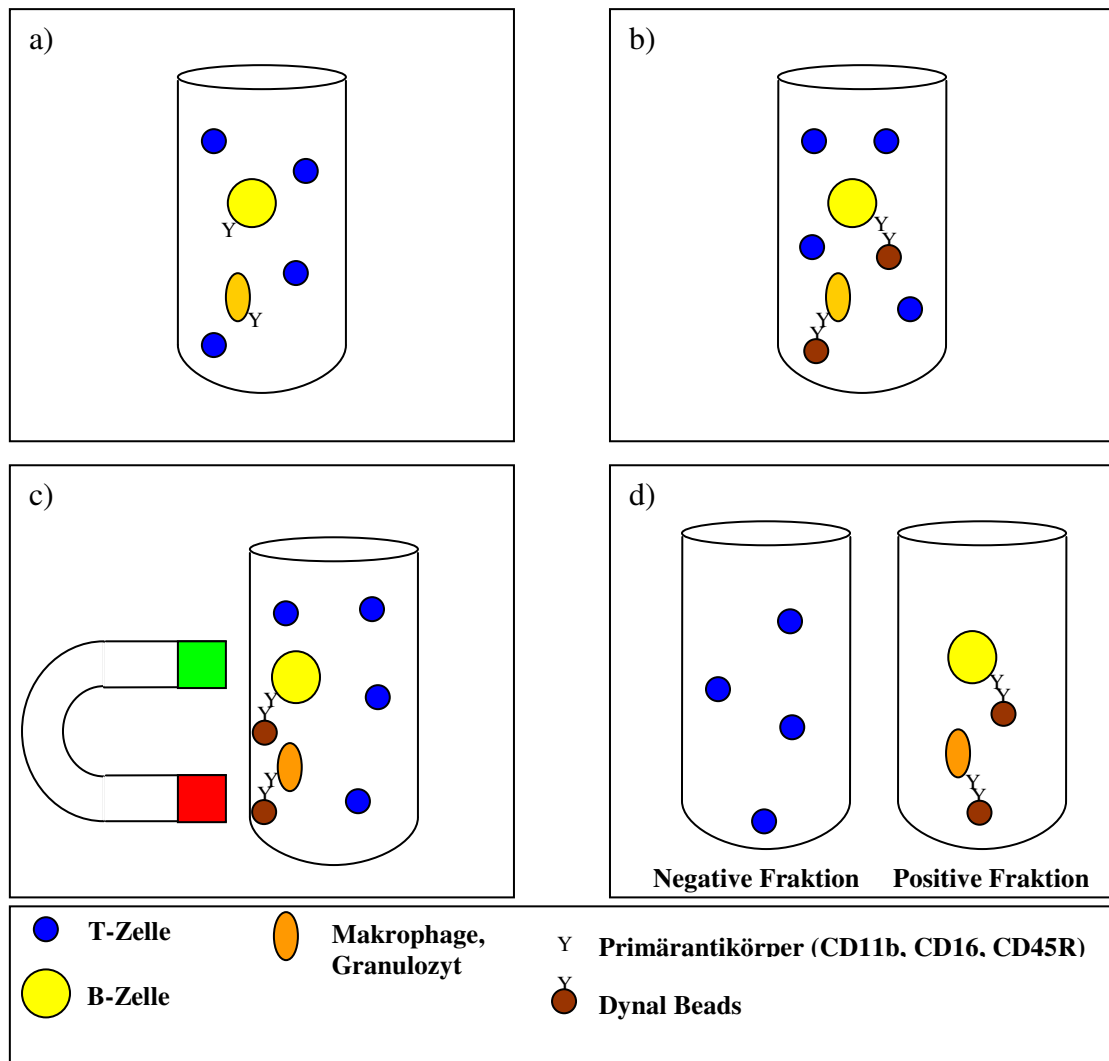


Abbildung 4: Prinzip der negativen Zellseparation: a) Inkubation mit den Primärantikörpern (MAC-1, anti-CD 16 und B220), b) Inkubation mit Dynal Beads als Sekundärantikörpern, c) Zelltrennung mittels eines Magneten (MPC-Dynal), d) negative und positive Fraktion nach Abpipettieren

2.3. CFSE-Markierung

Um das Proliferationsverhalten der injizierten Lymphozyten beurteilen zu können, wurden Lymphknoten- und Milzzellen mit CFSE (5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester) (Molecular Probes, Eugene, Oregon/AG Förster, MHH) markiert.

Die Markierung mit CFSE stellt eine einfache und sensitive Methode dar, um vor allem proliferierende Zellen zu untersuchen. Nach Diffusion über die Zellmembran wird intrazellulär durch Esterasen von CFSE eine Acetatgruppe abgespalten. Dadurch wird CFSE in einen fluoreszierenden Farbstoff überführt, der die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Während jeder Zellteilung sinkt die fluoreszierende Aktivität um die Hälfte, da es sich gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Somit können in der Durchflusszytometrie proliferierende Zellen in den verschiedenen Generationen dargestellt werden.

Nachdem die Zellen durch ein Netz gedrückt und in 10 ml PBS-Puffer aufgenommen wurden, wurden die Zellen zweimal gewaschen und anschließend gezählt. Die Zellen wurden dann in einer Konzentration von $50 \cdot 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert. Es erfolgte eine Vorinkubation im Wasserbad bei 37°C für ca. 30 Minuten. Anschließend wurden 10 μl der CFSE-Grundlösung (0,5mM) pro 1 ml der Zellsuspension zugegeben und für 15 Minuten bei 37°C in Dunkelheit inkubiert. Die abschließende CFSE-Konzentration betrug somit $5\mu\text{M}$. Um eine weitere Aufnahme von CFSE zu stoppen, wurden 10 ml kalter PBS-Puffer mit 1% FCS zugegeben [35, 95]. Es folgten zwei Waschvorgänge mit 10 ml PBS mit 1% FCS. Die erfolgreiche Markierung wurde abschließend durchflusszytometrisch überprüft. $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden schließlich in 0,2 ml PBS gelöst und intravenös den Empfängern appliziert.

2.4. Operative Eingriffe

2.4.1. Tierschutzrechtliche Bestimmungen

Die nachfolgend beschriebenen Versuche an der Maus wurden durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit mit Sitz in Oldenburg (AZ 04/883) genehmigt. Der Autor erhielt eine Ausnahmegenehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren gemäß § 9 Absatz 1 Satz 2 des Tierschutzgesetzes durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit mit Sitz in Oldenburg.

Weiterhin wurde ein 12stündiger Kurs „Einführung in die Versuchstierkunde“ an der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. H.-J. Hederich absolviert. Der Inhalt umfasste unter anderem das Tierschutzrecht, Hinweise zu Haltungsnormen, Medikamentenapplikation, peri- und postoperative Pflege, sowie Probengewinnung und Tötung von Tieren.

2.4.2. Tierhaltung

Alle Mäuse wurden während des gesamten Versuchszeitraums in einem Genlabor der Sicherheitsstufe 1 gehalten. Die Räume standen unter Überdruck und wurden nur nach Händedesinfektion und mit Schutzkleidung, Handschuhen, Mundschutz, Kopfhäube und Schuhschutz betreten.

Die Tiere wurden auf einem staubfreien Weichholzgranulat in einem Makrolonkäfig des Typs II gehalten. Die Raumtemperatur betrug konstant 20°C mit einer 50-60 prozentigen Luftfeuchtigkeit. Die Belichtung erfolgte in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Fütterung erfolgte *ad libitum* mit Altromin 1324 Alleinfutter (Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser. Der Gesundheitszustand wurde täglich durch das Pflegepersonal des Zentralen Tierlabors überwacht und monatlich durch veterinärmedizinische Kontrollen.

2.4.3. Orale Medikamentenapplikation

Zur oralen Applikation von FTY720 (1mg/kg KG in den Tagen 0-14 nach T-Zelltransfer) bzw. NaCl 0,9% (0,4 ml in den Tagen 0-14 nach T-Zelltransfer) wurden die Tiere mit der Hand im Nacken fixiert. Anschließend erfolgte die orale Gabe mittels einer Spritze und einer Knopfkanüle, die bis in den Magen eingeführt wurde.

2.4.4. Intraperitoneale Injektion

Für die intraperitoneale Injektion wurden die Tiere wie zur oralen Medikamentenapplikation fixiert. Die Punktion erfolgte mit einer 0,4mm Nadel (Sterican®, Braun, Melsungen). Während der Punktion und Injektion wurden die Tiere in einer leichten Kopf-Tieflage gehalten, um eine Verletzung der Bauchorgane zu vermeiden.

2.4.5. Intravenöse Injektion

Zur intravenösen Injektion wurden die lateralen Schwanzvenen der Tiere verwandt. Dazu wurden die Tiere in eine spezielle Injektionshilfe (Eigenbau der Forschungswerkstätten, MHH) fixiert. Um bessere Injektionsbedingungen zu schaffen, erfolgte eine Venendilatation durch Betupfen des Schwanzes mit einem Wattetupfer, der mit warmem Wasser getränkt wurde. Anschließend wurde die entsprechende Lösung mit einer 0,4mm Nadel (Sterican®, Braun, Melsungen) injiziert. Die Punktionsstelle wurde abschließend noch für einige Sekunden manuell komprimiert, um den Austritt von Blut zu verhindern.

2.4.6. Costimulationsblockade

Zur Costimulationblockade wurde den Tieren anti-CD40L-Antikörper (Clone MR-1) in einer Dosis von 500 µg an Tag 0, also am Tag der Transplantation, intravenös zusammen mit den donorspezifischen Milzzellen appliziert.

2.4.7. Donorspezifische Transfusion

Von dem jeweiligen Organspendertier wurde nach Tötung der Maus durch zervikale Dislokation die Milz entnommen. Diese wurde wie zur T-Zellgewinnung durch ein Nylonnetz gepresst. Nach einmaliger Zentrifugation erfolgte eine Lyse der Erythrozyten mittels Erylysepuffer. Anschließend wurden die Milzzellen zweimal mit TC199 gewaschen und schließlich in einer Konzentration von $4 \cdot 10^6$ Zellen in 0,1ml PBS für die intravenöse Injektion bereitgestellt.

2.4.8. Narkose, Nachbehandlung

Bei allen operativen Eingriffen wurden die Mäuse mit Ketamin (Ketanest®) und Xylazinhydrochlorid (Rompun®) narkotisiert. Dazu wurde eine Lösung aus 1/10 Ketamin und 1/10 Xylazinhydrochlorid und 8/10 Ringer-Laktat hergestellt. Männchen wurden 450 µl

(75 µg/g Ketamin bzw. 15 µg/g Xylazinhydrochlorid), Weibchen 350 µl (60 µg/g Ketamin bzw. 12 µg/g Xylazinhydrochlorid) appliziert. Die Lösung wurde intraperitoneal verabreicht. Zur schnelleren postoperativen Erholung wurden die Tiere auf einer Wärmematte bzw. unter einer Infrarotlampe erwärmt. Weiterhin erhielten die Tiere zur postoperativen Schmerztherapie für eine Woche Trinkwasser, dem Metamizol (Novaminsulfon rathiofarm®) in einer Konzentration von 8 Tropfen (200 mg) in 500 ml Wasser zugegeben wurde.

2.4.9. Herztransplantation

Die heterotope Herztransplantation an der Maus wurde modifiziert nach Corry *et al.* durchgeführt [96]. Vorgenommen wurden die Transplantationen von Frau Dr. Jiong Tian und Herrn Xiaosun Liu.

Die Operationsschritte werden im Folgenden getrennt beschrieben. Um die Ischämiezeiten möglichst kurz zu halten, wurde der Empfänger vor der Entnahme vorbereitet.

2.4.10. Organentnahme

Nach Wirkungseintritt der Narkose wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und der Schnitt dann nach lateral bis hinter die hintere Axillarlinie rippennah erweitert. Um die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior freizulegen wurden der Dünndarm und das Mesenterium auf die linke Seite gelagert.

Nun punktierte man die Vena cava inferior und applizierte etwa 1,5 ml eisgekühlte Ringer-Laktat Lösung mit insgesamt 300 IE Heparin. Die Kanüle verblieb einen Moment im Gefäß, um die Verteilung im Gefäßsystem zu gewährleisten. Dann wurde sie gezogen, um den Spender ausbluten zu lassen.

Zunächst erfolgte die Entnahme der Milz, um hieraus entsprechende Zellen für die donorspezifische Transfusion zu gewinnen.

Nun wurde der Thorax eröffnet, indem man die Rippen rechts und links der Wirbelsäule und das Zwerchfell durchtrennte und die gesamte Thoraxwand nach kranial klappte. Anschließend wurde das Herz mit einer kühlen feuchten Kompresse nach kranial gelagert, um freie Sicht auf die Vena cava inferior zu erhalten, die ligiert und distal durchtrennt wurde. Ebenso wurde mit der Vena azygos und der Vena cava superior verfahren. Die Aorta ascendens wurde vor dem Abgang des Truncus brachiocephalicus durchtrennt, danach der Truncus pulmonalis ebenso kurz vor der Bifurkation. Die Lungenvenen wurden ligiert, durchtrennt, das Herz nun

vorsichtig entnommen und in einer kalten Ringer-Laktat Lösung gelagert. Die Ischämiezeit betrug im Durchschnitt unter vierzig Minuten.

2.4.11. Operation des Empfängers

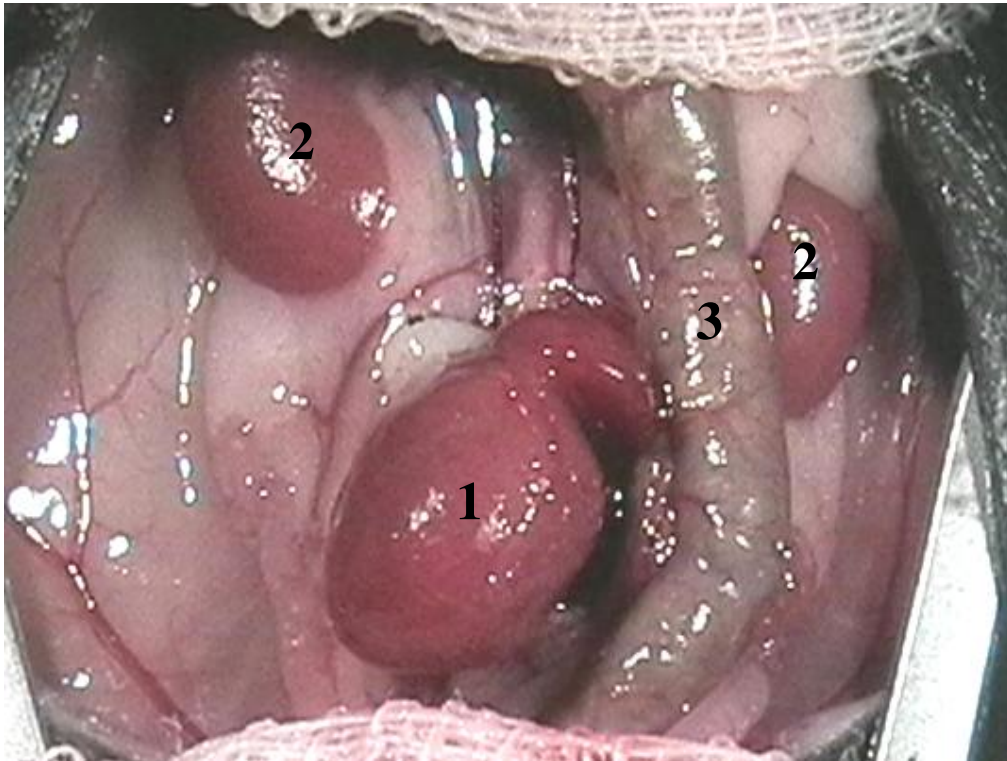
Nach Narkosebeginn wurde das Abdomen des Empfängers median bis zum Xiphoid eröffnet. Der Darm wurde nach Einlage des Retraktors nach kranial auf den Thorax gelagert. Um einer Austrocknung vorzubeugen, wurde der Darm in feuchte Kompressen gelegt. Ebenso wurden dabei Torsionen vermieden. Blase, Uterus bzw. Hoden und Samenblase wurden nach kaudal ebenfalls in feuchte Kompressen gelagert. Das Colon descendens wurde nun mobilisiert und mit einer feuchten Schlinge unter leichtem Zug nach links verlagert. Das dorsale Peritoneum parietale wurde eröffnet und die nach dorsal abgehenden Gefäße der Aorta abdominalis und der Vena cava inferior mit 7-0 Seide (Resorba, Nürnberg) ligiert. Anschließend erfolgte die Freilegung von Aorta abdominalis und Vena cava inferior von Fettgewebe. Hierbei wurde darauf geachtet, dass kleinere Blut- und Lymphgefäße nach Möglichkeit erhalten blieben.

Die Gefäße wurden kranial und kaudal abgeklemmt, die Aorta abdominalis mit einer Stichinzision (27-30g Kanüle) eröffnet und mit Ringer-Laktat Lösung gespült, sowie mit einer mikrochirurgischen Schere erweitert. Die Aorta des Transplantats wurde nun mit Haltenähten kranial und kaudal in Position gebracht und dann End-zu-Seit mit fünf Stichen anastomosiert. Dabei wurde 10-0 Ethilon® mit einer 3/8 6,5 mm Nadel (Nadel BV-2, Ethicon, Norderstedt) verwendet. Ebenso wurde die venöse Anastomose (Truncus pulmonalis) kaudal der aortalen Anastomose durchgeführt.

Um die Nähte wurde Tabotamp (Ethicon, Norderstedt) als Hämostyptikum gelegt, ohne die Gefäße zu komprimieren. Die distale Klemme wurde nun geöffnet. Nach einer Minute konnte auch die proximale Klemme entfernt werden. Das transplantierte Herz fing kurz darauf an zu schlagen.

Die ausgelagerten Organe wurden sorgfältig zurückgelegt, mit angewärmter Ringer-Laktat Lösung umspült und das Abdomen in zwei Schichten (Peritoneum und Haut) mit 4/0 Dexon® (Nadel HR 22, Ethicon, Norderstedt) geschlossen.

Der Empfänger erhielt abschließend noch 2 ml Ringer-Laktat subkutan zur einmaligen Volumensubstitution und wurde im weiteren Verlauf täglich überwacht.



**Abbildung 5: heterotope Herztransplantation: OP-Situs;
1: Herztransplantat, 2: rechte und linke Niere, 3: Colon descendens**

2.4.12. Beurteilung der Funktion des Transplantates

Die Funktion der transplantierten Herzen wurde durch Palpation und diagnostische Laparotomie beurteilt. Zur Beschreibung der Untersuchungsergebnisse bei der Palpation bediente man sich der Einteilung nach Corry [96], die eine Differenzierung von null bis vier vorsieht.

0	Keine spürbare Kontraktion
1	Sehr schwache Kontraktion und niedrige Frequenz
2	Erniedrigte Frequenz und/oder Arrhythmien
3	Verminderte Kontraktionsstärke mit normaler rhythmischer Frequenz
4	Normale Frequenz und regelrechter Rhythmus

Tabelle 4: Corry Score, Funktion von Herztransplantaten [96]

Bei unsicherem palpatorischem Befund und zur abschließenden Kontrolle wurde eine diagnostische Laparotomie durchgeführt, die eine visuelle Beurteilung erlaubte.

2.4.13. Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurden die Tiere kurzzeitig mit Äther narkotisiert; dabei wurde zum Eigenschutz eine Atemmaske (Halbmaske SR100 Silicone SIM, Sundström) getragen. Nun wurde mit einer heparinisierten Glaskapillare der retrookuläre Venenplexus punktiert und das Blut in die Kapillare aufgenommen. Anschließend wurde das Blut durch Herunterschlagen in ein EDTA-Röhrchen oder direkt in ein FACS-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert, bis es weiterverarbeitet wurde.

2.4.14. Tötung und Organentnahme zwecks T-Zellseparation und Organanalyse

Die Tiere wurden durch Begasung mit Kohlenstoffdioxid getötet und zervikal disloziert.

Für die T-Zellgewinnung wurden die Milz sowie Lymphknoten verwendet. Dazu wurde die Milz via Laparatomie entfernt, sowie die inguinalen, paraaortalen, mesenterialen, axillären und submandibulären Lymphknoten herauspräpariert. Bei der Organanalyse beschränkte sich das Spektrum der Lymphknoten auf das entsprechende Drainagegebiet, also auf mesenteriale, inguinale und paraaortale Lymphknoten. Für Blutproben wurde entweder der retrookkuläre Venenplexus mit einer heparinisierten Kapillare oder bei finalen Versuchen die Vena cava inferior punktiert.

2.5. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorter, FACS) wurde benutzt, um die Reinheit der negativ selektierten Zellen zu bestimmen und den Erfolg der CFSE-Markierung zu kontrollieren. Außerdem wurden mit ihr die Proliferation der Lymphozyten und deren Expression von Aktivierungsmarkern (CD25, CD44, CD45RB, CD62L, CD69 und CD122) untersucht.

Pro Probenröhrchen wurden $5 * 10^5$ Zellen in 2 ml FACS-Puffer bei einer Temperatur von ca. 4°C gegeben. Die Zellen wurden nun zweimal gewaschen und zentrifugiert (1000/Min., 3 Min., 4°C). Zunächst wurde eine Vorinkubation mit CD16 für fünf Minuten durchgeführt, um unspezifische Bindungen der nachfolgend eingesetzten Antikörper zu verhindern. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern für ca. 20 Minuten bei 4°C in Dunkelheit. Erneut wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Medium gewaschen. Bei Verwendung von biotinylierten Antikörpern schloss sich ein zweiter Färbeschritt mit Streptavidin für ebenfalls 20 Minuten an. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer gelöst und im Forward-Scatter-Modus (FACScan oder FACScalibur, BD Biosciences, USA) gemessen.

Um den Reinheitsgrad der negativen Separation der T-Zellen zu überprüfen, wurde ein anti-CD3 Antikörper (KT₃ FITC) genutzt. Zudem wurden die Zellen mit einem Goat-anti-Rat Antikörper inkubiert, um zu kontrollieren, inwiefern der Primärantikörper der negativen Separation gebunden hatte.

Um den Erfolg der CFSE-Markierung zu kontrollieren, wurden Zellen vor CFSE-Inkubation als Kontrollprobe und Zellen nach CFSE-Inkubation entnommen, lediglich zweimal gewaschen und anschließend zur Messung in 200 µl FACS-Puffer gelöst.

Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in folgender Tabelle gelistet.

Name	Klon	Spezifität	Bezugsquelle	Verdünnung
CD16	2.4G2	Fcy III/II	AG Hoffmann	1:350
CD3 FITC	KT3	mCD3	AG Hoffmann	1:100
CD3 PE	145.2C11	mCD3 ϵ	BectonDicinson	1:10
CD3 bio	145.2C11	mCD3 ϵ	AG Hoffmann	1:20
Goud-anti-Rat FITC		Rattenantikörper	AG Hoffmann	1 :20
Thy1.2 FITC	T24	Thymozyten CD90	BectonDicinson	1:200
CD4 FITC	GK1.5	mCD4	Pharmingen	1:160
CD4 PE	GK1.5	mCD4	BectonDickinson	1:50
CD8 FITC	53-6.7	mCD8	AG Hoffmann	1:40
CD8 PE	53-6.7	mCD8	BectonDickinson	1:160
CD8 bio	53-5.8	mCD8	Pharmingen	1:160
CD25 bio	PC61/ IL-2R α	mCD25	AG Hoffmann	1:80
CD44 PE	IM7	mCD44	Pharmingen	1:600
CD45.1 PE	A20	mCD45Ly5.1	Pharmingen	1:50
CD45.1 bio	A20	mCD45Ly5.1	Pharmingen	1:50
CD45RB bio	23G2	mCD45RB	Pharmingen	1:80
CD62L bio	Mel-14	mCD62L	AG Hoffmann	1:2000
CD69 PE	H1.2F3	mCD69	BectonDickinson	1:30
CD122 PE	IL-2R β	mCD122	Pharmingen	1:400
Streptavidin/ Allophycocyanin (APC)		Biotin	Caltag	1:200
Normales Maus Serum			AG Hoffmann	1:25

Tabelle 5: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie und die daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe. Bei den direkt an den monoklonalen Antikörpern gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen handelt es sich um Fluoroisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Biotin (bio)-gekoppelte Antikörper reagieren mit der Fluoreszenzsubstanz Streptavidin/Allophycocyanin (APC).

3. Ergebnisse

3.1. Reinheit der negativen Separation

Um T-Zellen zu gewinnen, die anschließend in die entsprechenden Versuchstiere überführt wurden, wurde die Methode der negativen Separation angewandt. Aus Lymphknoten und Milz gewonnene Zellen wurden dabei mit Primärantikörpern (MAC-1, CD16, CD45R), anschließend mit Dynalbeads® als Sekundärantikörpern behandelt und dann in einem Magnetfeld getrennt. Die Reinheit wurde jedes Mal mittels der Durchflusszytometrie überwacht. Proben wurden dazu vor der Inkubation mit dem Primärantikörper, nach Inkubation mit dem Primärantikörper und aus der negativ separierten Fraktion entnommen. Die Reinheit der T-Zellen in der negativen separierten Fraktion betrug dabei 93,43 +/- 1,77 % (siehe Abbildung 6).

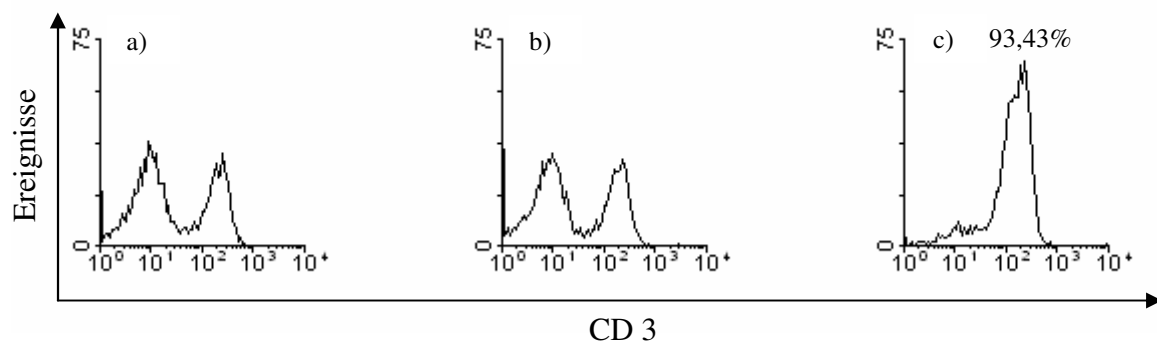


Abbildung 6: Reinheit der T-Zellseparation: a) Zellen vor Inkubation mit Primärantikörpern, b) Zellen nach Inkubation mit Primärantikörpern, c) negative Fraktion (T-Zellen);
Abszisse: CD3, Ordinate: Ereignisse

3.2. CFSE-Labeling

Um Untersuchungen zur Zellproliferation vornehmen zu können, wurden Lymphknoten- und Milzzellen mittels CFSE gefärbt und anschließend intravenös den Empfängertieren appliziert. Zuvor wurde der Erfolg der intrazellulären CFSE-Aufnahme durchflusszytometrisch kontrolliert. Dabei konnten $95,36 \pm 2,45\%$ der Zellen als CFSE positiv registriert werden (siehe Abbildung 7).

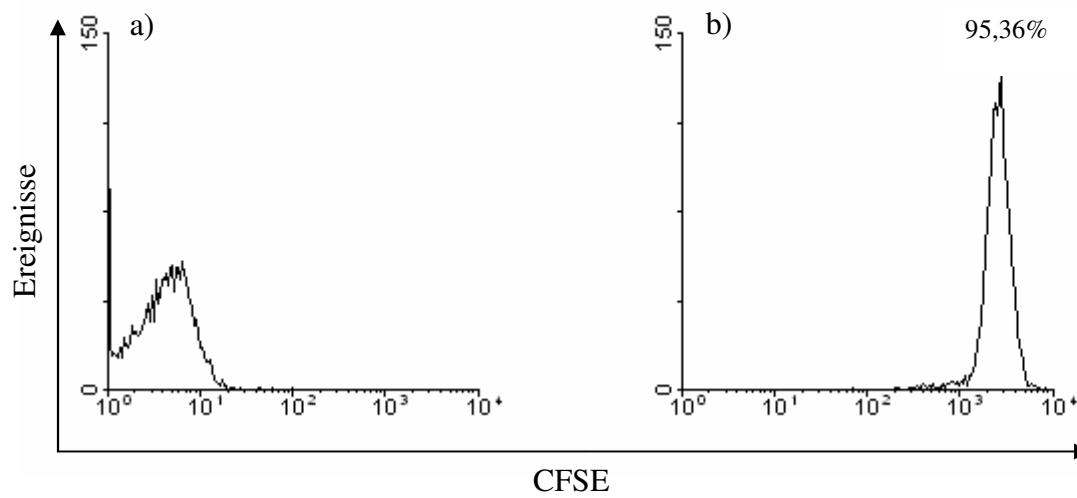


Abbildung 7: CFSE-Labeling: a) Zellen vor CFSE-Inkubation, b) Zellen nach CFSE-Inkubation; Abzisse: CFSE, Ordinate: Ereignisse

3.3. Untersuchungen zur Proliferationsanalyse

Da besonders die Rolle der homeostatischen Proliferation untersucht werden sollte, musste zunächst ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt nach Applikation der CFSE-markierten Zellen die proliferierenden Zellen optimal zu beurteilen sind.

Hierzu wurden CFSE-markierte Zellen intravenös in RAG2^{-/-}-Empfänger transferiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte eine Analyse der Zellproliferation mit der Durchflusszytometrie.

An Tag 2 konnte noch keine Proliferation beobachtet werden. Bereits an Tag 10 waren keinerlei CFSE-positive Zellen zu ermitteln, so dass davon ausgegangen werden muss, dass zu diesem Zeitpunkt alle Zellen mehrfach proliferiert waren. Die einzelnen Proliferationsstufen zeigten sich am besten an Tag 5, so dass für die folgenden Untersuchungen zum Proliferationsverhalten dieser Zeitpunkt standardmäßig gewählt wurde. Zur nachfolgenden Analyse der Zellen erfolgte eine Einteilung in drei Zellfraktionen, die mit den Gates R1 bis R3 bezeichnet wurden. Dabei repräsentierte das Gate R1 bereits proliferierte Zellen, R2 Zellen, die sich noch in Proliferation befanden und R3 Zellen, die noch nicht proliferiert waren.

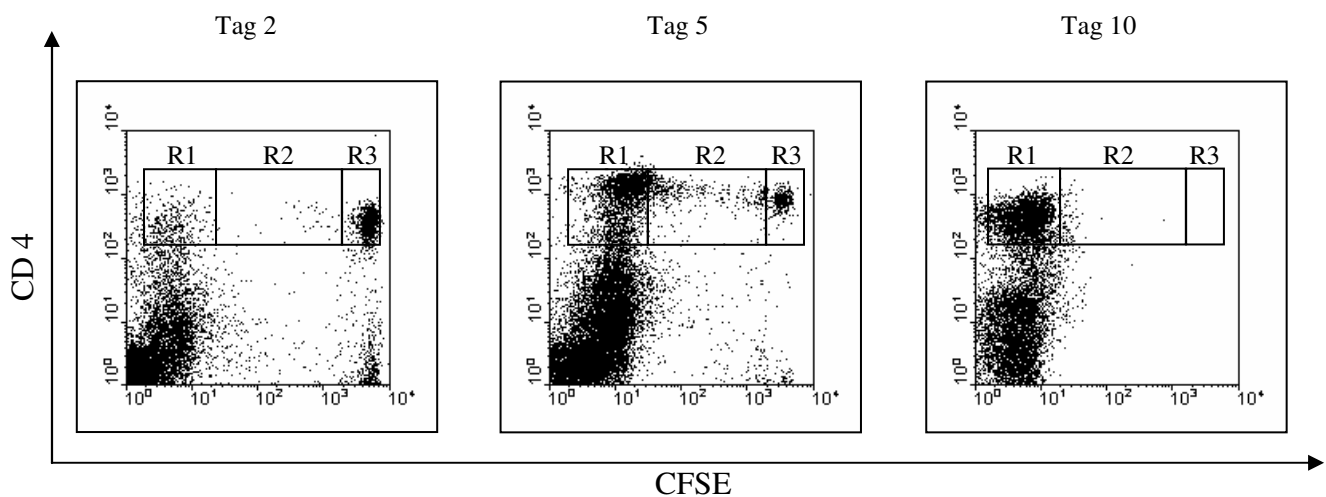


Abbildung 8: Proliferationsverhalten transferierter Lymphozyten zu verschiedenen Zeitpunkten: An Tag 2 zeigt sich noch keinerlei Proliferation, an Tag 5 sind bereits Zellen proliferiert bzw. befinden sich noch in Proliferation, an Tag 10 sind alle Zellen so oft proliferiert, dass keine CFSE-positiven Zellen nachweisbar sind. CD8-T-Zellen zeigten vergleichbare Ergebnisse.

3.4. T-Zell-Konzentration

Um zu ermitteln, welche T-Zell-Menge einer RAG2^{-/-}-Maus injiziert werden muss, damit sie möglichst in dem selben Zeitintervall das Transplantat abstößt, wie der Wildtyp (C57Bl/6), wurden RAG2^{-/-}-Mäuse mit verschiedenen T-Zell-Dosen in aufsteigender Reihenfolge rekonstituiert und anschließend mit Herzen einer BALB/c-Maus transplantiert.

Empfänger, die eine T-Zelldosis von $1 \cdot 10^5$ T-Zellen erhalten hatten, stießen das Transplantat im Mittel nach 29 +/- 10,4 Tagen ab (n=5). Bei einer T-Zell-Dosis von $1 \cdot 10^6$ T-Zellen wurde eine Abstoßung nach 25,9 +/- 6,6 Tagen beobachtet (n=7). Schließlich führte eine Menge von $1 \cdot 10^7$ T-Zellen nach 18,3 +/- 2,1 Tagen zur Abstoßung (n=6). Bei Wildtyp-Empfängern (C57Bl/6) wurde das Herz nach 10,3 +/- 1 Tagen abgestoßen (n=4). Wurden BALB/c-Herzen in RAG2^{-/-}-Empfänger ohne Behandlung transplantiert, so erfolgte auch nach einem Beobachtungszeitraum von 100 Tagen keine Abstoßung (n=3).

Da bei einer T-Zell-Menge von $1 \cdot 10^7$ T-Zellen die stabilsten Ergebnisse beobachtet wurden, wurden in den weiteren Versuchen zur T-Zell-Rekonstitution jeweils $1 \cdot 10^7$ T-Zellen in die Empfänger appliziert, auch wenn sich nicht der Zeitraum erreichen ließ, der bei Wildtyp-Empfängern zu ermitteln war.

Spender	Empfänger	n	Transplantat- überleben Tage	Durch- schnitt Tage	Signifikanz
BALB/c	RAG2 ^{-/-}	3	>100 x 3	>100	P<0,05
BALB/c	B6	4	9, 10, 11, 11	10,3	
BALB/c	RAG2 ^{-/-} + $1 \cdot 10^5$ T-Zellen	5	14, 29, 30, 34, 38	29,0	
BALB/c	RAG2 ^{-/-} + $1 \cdot 10^6$ T-Zellen	7	17, 19, 20, 24, 32, 33, 36	25,9	
BALB/c	RAG2 ^{-/-} + $1 \cdot 10^7$ T-Zellen	7	12, 16, 17, 18, 20, 21, 24	18,3	

Tabelle 6: Benötigte T-Zell-Konzentration zur Abstoßung von BALB/c-Herzen in RAG2^{-/-}-Mäusen

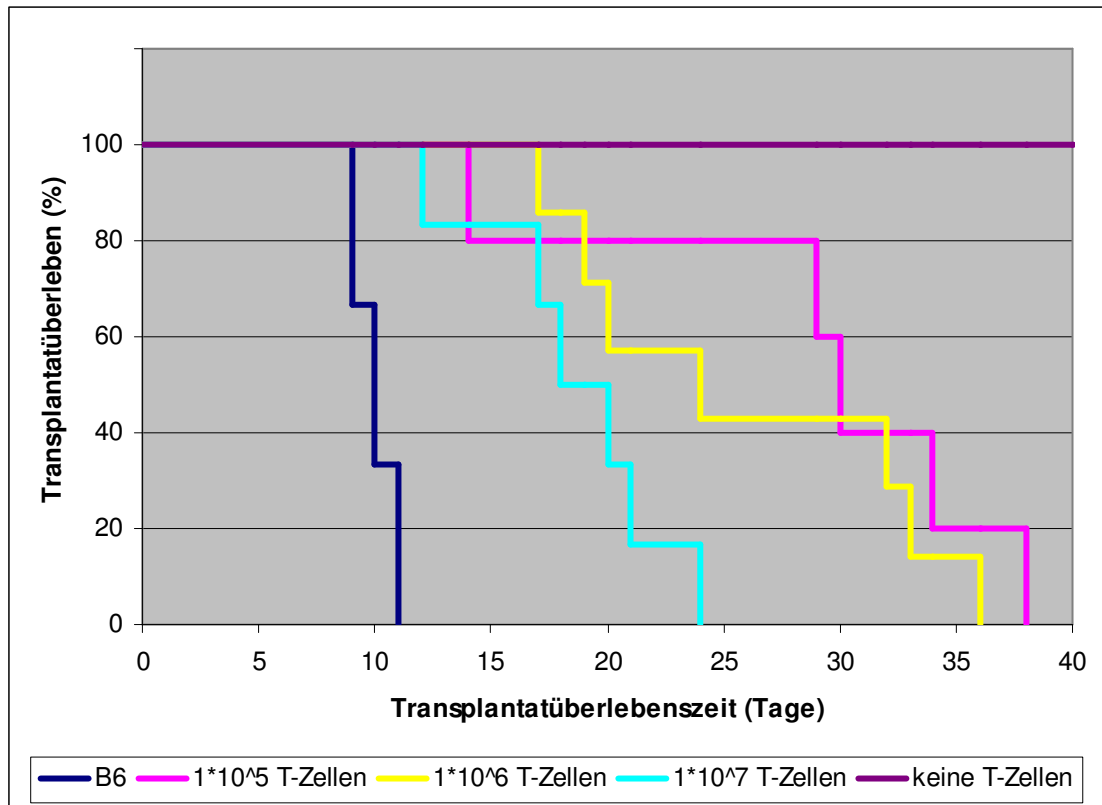


Abbildung 9: Abszisse: Transplantatüberlebenszeit in Tagen, Ordinate: prozentuales Transplantatüberleben;
Spender BALB/c, Empfänger: RAG2^{-/-} mit verschiedenen T-Zell-Dosen

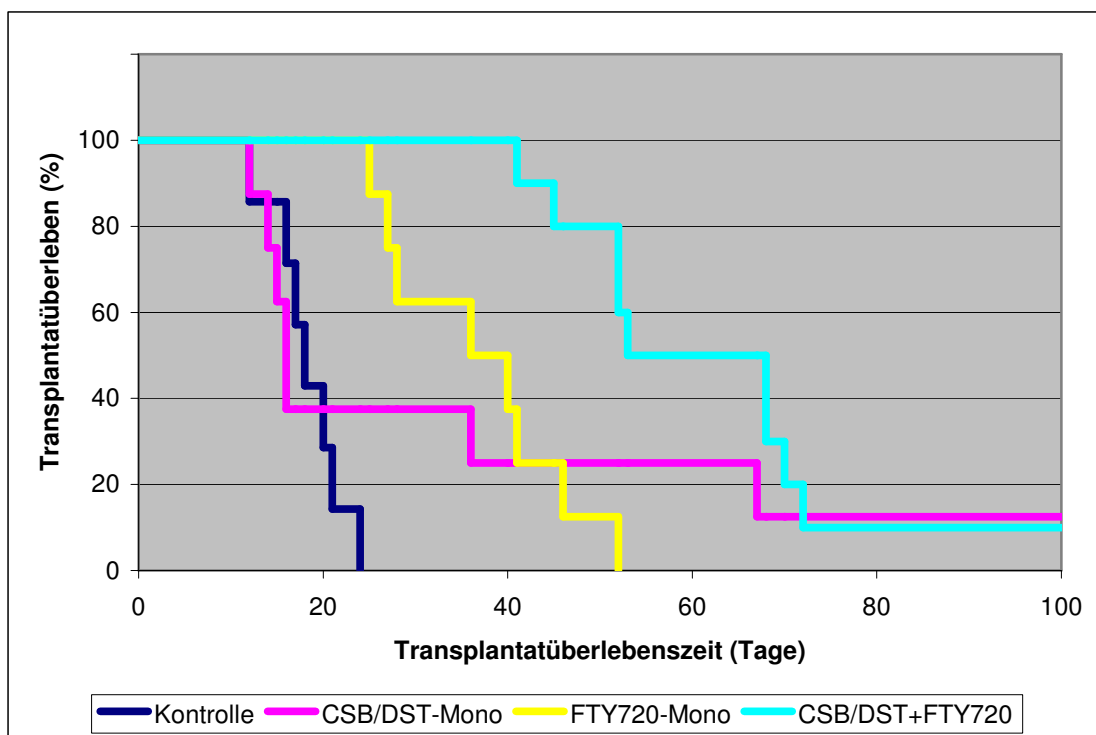
3.5. FTY720-Einfluß in T-Zell-rekonstituierten RAG2^{-/-}-Mäusen nach Toleranzinduktionsprotokoll

Die Arbeitsgruppe um Wu hat beschrieben, dass in T-Zell-rekonstituierten Empfängertieren eine periphere Toleranzinduktion mittels einer Costimulationsblockade nicht möglich ist. Um die Hypothese zu überprüfen, dass T-Zell-rekonstituierte Mäuse dann erneut der Toleranzinduktion zugänglich sind, wenn sie neben dem Toleranzinduktionsprotokoll zusätzlich den Immunmodulator FTY720 erhalten, wurden BALB/c-Herzen in entsprechend rekonstituierte RAG2^{-/-}-Mäuse transplantiert. Die Versuchsgruppe wurde in den ersten 14 postoperativen Tagen täglich mit 1mg/kg KG FTY720 oral behandelt, am Tag der Transplantation wurden zudem donorspezifische Milzzellen als donorspezifische Transfusion (DST) und der anti-CD40-Ligand MR-1 zur Costimulationsblockade (CSB) intravenös appliziert (FTY720+CSB/DST-Gruppe). Die erste Kontrollgruppe erhielt dagegen 14 Tage lang NaCl 0,9% oral und am Tag der Transplantation DST und MR-1 (CSB/DST-Monotherapie-Gruppe). Der zweiten Kontrollgruppe wurde FTY720 alleine 14 Tage lang oral verabreicht, am Tag der Transplantation selber wurde zudem Kochsalz intravenös gespritzt (FTY720-Monotherapie-Gruppe). Schließlich wurde einer dritten Kontrollgruppe NaCl 0,9% sowohl am Tag der Herztransplantation i.v. verabreicht, als auch für 14 Tage lang oral.

Die Herzen der Versuchsgruppe (FTY720+CSB/DST-Gruppe) wurden nach 62,1 +/- 17,3 Tagen abgestoßen (n=10). Im Gegensatz dazu fand eine Abstoßung der Transplantate in der Kontrollgruppe, die nur donorspezifische Zellen plus MR-1 erhielten, schon nach 34,5 +/- 32,4 Tagen statt (n=8). Wurden die Tiere mit FTY720 alleine behandelt, so konnte eine Abstoßung nach 36,9 +/- 9,7 Tagen beobachtet werden (n=8). Dahingegen war eine Überlebenszeit von 18,3 +/- 3,9 Tagen in der Kontrollgruppe zu erkennen, die außer der T-Zellrekonstitution keinerlei Behandlung erfahren hatte.

Spender	Empfänger	n	Transplantat- überleben in Tagen	Durch- schnitt Tage	Signifikanz (T-Test)
BALB/c	RAG2 ^{-/-} + T-Zellen	7	12, 16, 17, 18, 20, 21, 24	18,3	p<0,05
BALB/c	RAG2 ^{-/-} + T-Zellen + FTY720	8	25, 27, 28, 36, 40, 41, 46, 52	36,9	
BALB/c	RAG2 ^{-/-} + T-Zellen + CSB/DST + NaCl 0,9%	8	12, 14, 15, 16, 16, 36, 67, >100	34,5	
BALB/c	RAG2 ^{-/-} + T-Zellen + FTY720 + CSB/DST	10	41, 45, 52, 52, 53, 68, 68, 70, 72, >100	62,1	

Tabelle 7: Einfluss von FTY720 auf das Überleben von Herztransplantaten in der RAG2^{-/-}-Maus nach Toleranzinduktionsprotokoll, p-Werte nach T-Test alle in Bezug zur Gruppe RAG2^{-/-} + T-Zellen + FTY720 + CSB/DST



**Abbildung 10: Abszisse: Transplantatüberlebenszeit in Tagen, Ordinate: prozentuales Transplantatüberleben;
Spender BALB/c, Empfänger: RAG2^{-/-}**

3.6. Proliferationsverhalten von Lymphozyten in RAG2^{-/-}-Empfängern

Um das Proliferationsverhalten von Lymphozyten in lymphopenen Empfängern unter dem Einfluss von FTY720, der Costimulationsblockade und der donorspezifischen Transfusion zu beurteilen, wurden CFSE-markierte Lymphknoten- und Milzzellen von Ly5.1-Spendern in RAG2^{-/-}-Mäuse intravenös appliziert. Die Versuchsgruppe erhielt eine Kombination aus Costimulationsblockade, donorspezifischer Transfusion und FTY720 (FTY720+CSB/DST-Gruppe). Bei der ersten Kontrollgruppe erfolgte eine Monotherapie mit FTY720 einmal täglich (FTY720-Monotherapie-Gruppe). Die zweite Kontrollgruppe bekam zur Costimulationsblockade MR-1 und zur donorspezifischen Transfusion Milzzellen von BALB/c-Tieren (CSB/DST-Monotherapie-Gruppe), in der dritten Kontrollgruppe wurde nur NaCl 0,9% oral verabreicht. An Tag fünf wurden die LK-Zellen der Empfängertiere per Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurden nur die Lymphozyten mittels eines entsprechenden Gates berücksichtigt. Insbesondere erfolgte eine Analyse der bereits proliferierten/schnell proliferierten Zellen (Gate R1), der in Proliferation befindlichen Zellen (Gate R2) und der noch nicht proliferierten Zellen (Gate R3) (siehe Abbildungen 11 und 12). Jeder Versuch wurde dabei dreimal durchgeführt.

Bei der Betrachtung der transferierten Ly5.1-Zellen konnte unter der Kombinationstherapie ein signifikant höherer Anteil an proliferierten Zellen (Gate R1) von 67,13 +/- 5,69% beobachtet werden, als bei Zellen, die nur eine der beiden Monotherapien erhalten hatten (FTY720-Monotherapie 44,16 +/- 0,57%; CSB/DST-Monotherapie 38,39 +/- 8,39%) bzw. die der Kontrollgruppe zugehörig waren (35,54 +/- 7,57%). Gleichzeitig zeigte sich bei den noch nicht proliferierten Zellen in Gate R3 ein genau gegenteiliges Ergebnis. Hier waren signifikant weniger Zellen in der Kombinationstherapiegruppe zu registrieren, als in den anderen Gruppen.

Bei der Analyse der CD3 positiven Zellen zeigten sich zunächst nur dezente Unterschiede. Bei den CD8-T-Lymphozyten fand sich ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei allen Ly5.1-Zellen, wobei teilweise eine große Standardabweichung in einzelnen Gruppen eine klare Signifikanz nicht erkennen ließ. Ein eher gegenteiliges Bild konnte bei den CD4-T-Zellen beobachtet werden: hier war bei den schnell proliferierten Zellen der Anteil in der Kontrollgruppe wesentlich größer (49,47 +/- 21,84%) als bei der Gruppe, die mit der Kombinationstherapie behandelt wurde (14,35 +/- 9,98%) oder die nur mit der CSB/DST-Monotherapie behandelt wurde (10,78 +/- 8,31%). Der Anteil der CD4-T-Zellen in der FTY720-Monotherapiegruppe ähnelte dem der Kontrollgruppe (43,78 +/- 8,44%).

Im Bereich der langsam proliferierenden Zellen (Gate R2) zeigten sich insgesamt keine oder nur dezente Unterschiede.

Weiterhin erfolgte eine Analyse der Aktivierungsmarker (CD25, CD44, CD45RB, CD62L, CD69, CD122) der transferierten Zellen. Trotz des offensichtlich unterschiedlichen Verhaltens in der Proliferation der T-Zellen unter FTY720-Therapie bzw. unter Behandlung mit CSB/DST oder einer Kombination aus CSB/DST und FTY720 konnte in Bezug auf CD25, CD44, CD62L, CD69 und CD122 nur dezente Unterschiede festgestellt werden. Die markantesten Unterschiede fanden sich vor allem bei der Untersuchung von CD62L. So exprimierten signifikant mehr Zellen im Gate R1 das Adhäsionsmolekül ($11,8 \pm 3,67\%$), wenn sie die Kombinationstherapie erhalten hatten, als Zellen der anderen Gruppen (Kontrollgruppe: $2,35 \pm 1,04$; FTY720-Mono: $4,42 \pm 0,08\%$; CSB/DST-Mono: $8,0 \pm 3,29\%$). Aber auch bei der Analyse von CD25 war bei den schnell proliferierten Zellen der Anteil der CD25 positiven Zellen tendenziell größer, wenn eine Behandlung mittels CSB/DST erfolgte, unabhängig davon ob eine zusätzliche Gabe von FTY720 erfolgte oder nicht.

Insgesamt fällt auf, dass unter der Kombinationstherapie der Anteil der schnell proliferierten Zellen tendenziell größer ist, als in den anderen Gruppen. Unabhängig von einer FTY720-Gabe führt eine Behandlung mit CSB/DST zu einem größeren Anteil von schnell proliferierten CD8-T-Zellen. Gegenteiliges kann bei CD4-T-Zellen beobachtet werden. Ein Einfluss auf die Aktivierungsmarker ist eher als gering zu betrachten.

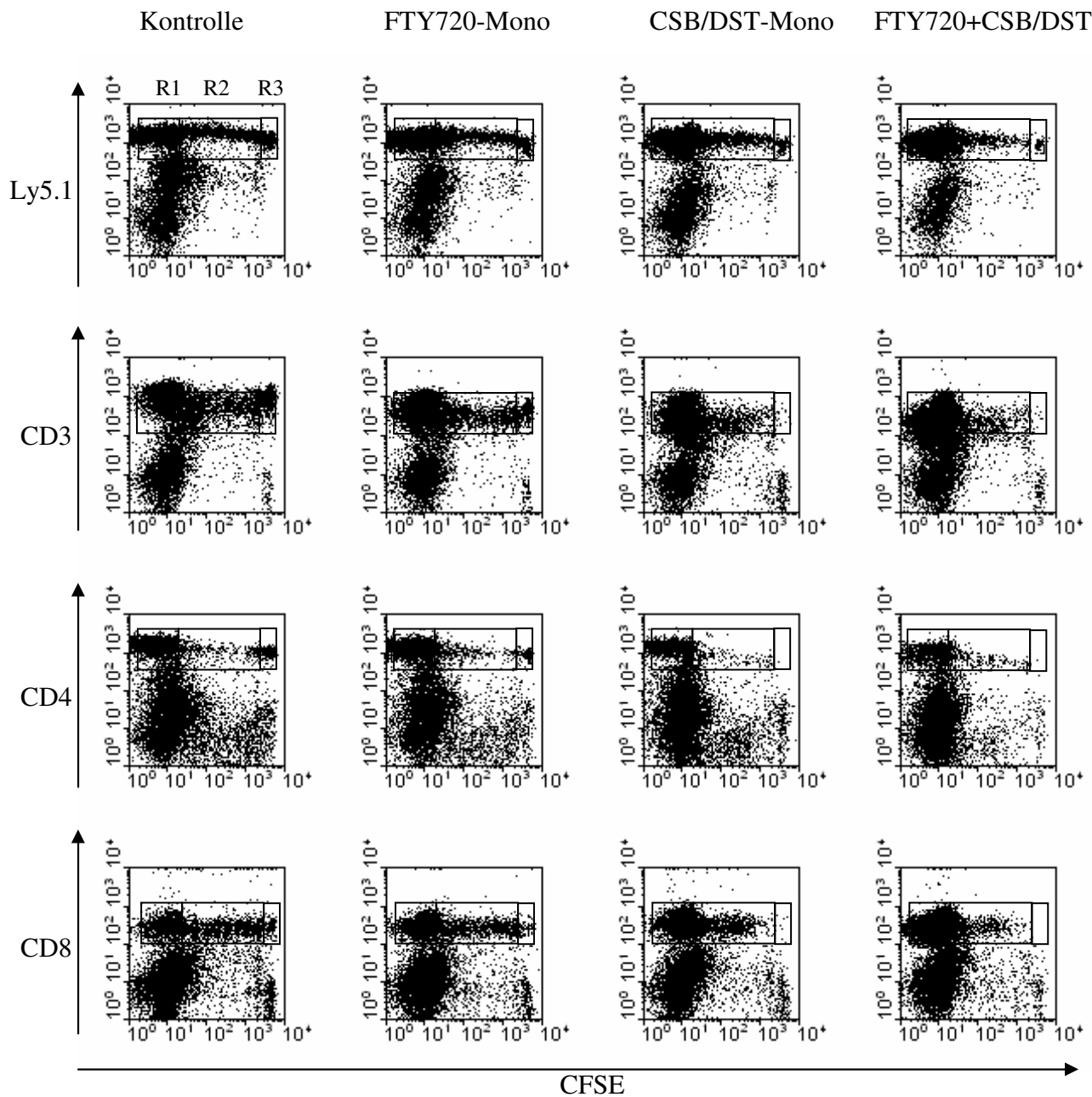
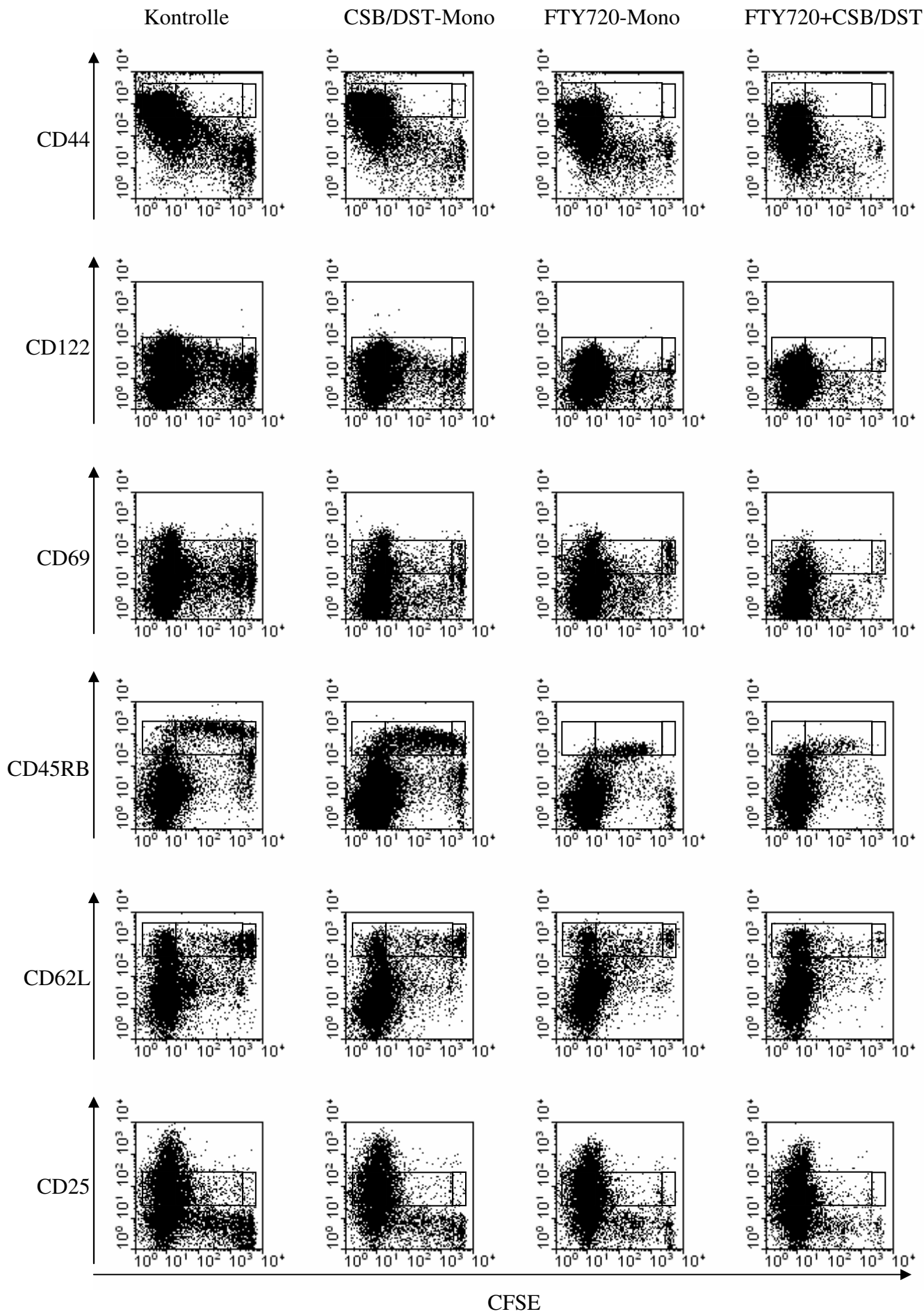


Abbildung 11: Proliferationsverhalten injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in RAG2^{-/-}-Mäusen, ohne Behandlung, mit FTY720-Monotherapie, CSB/DST-Monotherapie und Kombinationstherapie aus FTY720 und CSB/DST. Analyse an Tag 5. Gate auf Ly5.1-positive Zellen.

Abbildung 12 (nächste Seite): Proliferationsverhalten und Expressionsmuster injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in RAG2^{-/-}-Mäusen ohne Behandlung, mit FTY720-Monotherapie, CSB/DST-Monotherapie und Kombinationstherapie aus FTY720 und CSB/DST. Analyse an Tag 5. Gate auf Ly5.1-positive Zellen.



Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
Ly 5.1	Kontrolle	3	35,54 +/- 7,57%	*	12,79 +/- 5,27%	nicht signifikant	5,82 +/- 1,99%	*
	FTY720- Mono	3	44,16 +/- 0,57%		13,77 +/- 3,05%		4,05 +/- 0,28%	
	CSB/DST- Mono	3	38,98 +/- 8,39%		10,71 +/- 4,09%		3,18 +/- 0,02%	
	FTY720 + CSB/DST	3	67,13 +/- 5,69%		9,55 +/- 1,02%		0,63 +/- 0,73%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 3	Kontrolle	3	66,96 +/- 12,6%	nicht signifikant	18,68 +/- 7,41%	nicht signifikant	5,6 +/- 2,21%	*
	FTY720- Mono	3	69,15 +/- 8,03%		17,06 +/- 3,36%		3,66 +/- 0,32%	
	CSB/DST- Mono	3	57,93 +/- 20,91%		16,38 +/- 2,5%		2,66 +/- 2,1%	
	FTY720 + CSB/DST	3	79,18 +/- 5,2%		12,19 +/- 2,99%		1,04 +/- 0,86%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 4	Kontrolle	3	49,47 +/- 21,84%	*	6,91 +/- 1,93%	*	4,45 +/- 2,83%	*
	FTY720- Mono	3	43,78 +/- 8,44%		7,85 +/- 0,68%		3,28 +/- 0,35%	
	CSB/DST- Mono	3	10,78 +/- 8,31%		6,77 +/- 5,88%		1,37 +/- 1,47%	
	FTY720 + CSB/DST	3	14,35 +/- 9,98%		2,73 +/- 0,9%		0,66 +/- 0,5%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 8	Kontrolle	3	3,15 +/- 3,0%	*	11,73 +/- 1,53%	*	6,95 +/- 5,07%	nicht signifikant
	FTY720- Mono	3	1,71 +/- 2,65%		9,77 +/- 3,96%		5,13 +/- 5,09%	
	CSB/DST- Mono	3	47,76 +/- 23,65%		4,48 +/- 1,95%		1,36 +/- 0,48%	
	FTY720 + CSB/DST	3	40,25 +/- 31,83%		14,44 +/- 1,21%		1,71 +/- 0,91%	

Tabelle 8: Proliferationsverhalten injizierten Lymphozyten nach CFSE-Markierung in RAG2^{-/-}-Mäusen, ohne Behandlung, mit FTY720-Monotherapie, CSB/DST-Monotherapie und Kombinationstherapie aus FTY720 und CSB/DST. Analyse an Tag 5. Gate auf Ly5.1-positive Zellen.

* = p < 0,05

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 44	Kontrolle	3	59,13 +/- 13,17%	nicht signifikant	8,31 +/- 7,24%	nicht signifikant	0,86 +/- 0,58%	nicht signifikant
	FTY720-Mono	3	62,84 +/- 8,44%		10,45 +/- 3,62%		0,56 +/- 0,22%	
	CSB/DST-Mono	3	58,66 +/- 14,77%		10,63 +/- 0,4%		4,58 +/- 3,99%	
	FTY720 + CSB/DST	3	53,61 +/- 25,17%		7,83 +/- 13,01%		1,04 +/- 0,78%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 122	Kontrolle	3	51,03 +/- 4,58%	nicht signifikant	10,49 +/- 9,69%]	2,7 +/- 2,28%	nicht signifikant
	FTY720-Mono	3	62,36 +/- 6,66%		9,44 +/- 4,74%		1,36 +/- 1,0%	
	CSB/DST-Mono	3	54,13 +/- 6,22%		8,94 +/- 0,2%		2,7 +/- 1,37%	
	FTY720 + CSB/DST	3	56,89 +/- 14,22%		6,56 +/- 0,78%		0,73 +/- 0,27%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 69	Kontrolle	3	11,15 +/- 3,41%	nicht signifikant	10,12 +/- 6,69%]	3,46 +/- 2,4%]
	FTY720-Mono	3	10,55 +/- 0,81%		8,05 +/- 2,76%		2,06 +/- 1,21%	
	CSB/DST-Mono	3	11,23 +/- 0,66%		10,46 +/- 1,5%		3,43 +/- 0,38%	
	FTY720 + CSB/DST	3	17,91 +/- 13,35%		6,63 +/- 1,11%		1,48 +/- 0,37%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 45RB	Kontrolle	3	2,47 +/- 1,91%	nicht signifikant	10,3 +/- 6,42%	nicht signifikant	1,91 +/- 0,52%]
	FTY720-Mono	3	1,87 +/- 0,35%		8,09 +/- 1,51%		1,35 +/- 0,56%	
	CSB/DST-Mono	3	4,02 +/- 0,0%		10,69 +/- 0,0%		0,1 +/- 0,0%	
	FTY720 + CSB/DST	3	9,06 +/- 5,47%		5,67 +/- 2,28%		0,18 +/- 0,11%	

Tabellen 9: Proliferationsverhalten injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in RAG2^{-/-}-Mäusen, ohne Behandlung, mit FTY720-Monotherapie, CSB-Monotherapie und Kombinationstherapie aus FTY720 und CSB/DST. Analyse an Tag 5. Gate auf Ly5.1-positive Zellen.

* = p < 0,05

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 62L	Kontrolle	3	2,35 +/- 1,04%		7,61 +/- 5,73%	nicht signifikant	5,32 +/- 2,55%	
	FTY720- Mono	3	3,42 +/- 0,08%		8,35 +/- 0,95%		4,54 +/- 0,38%	
	CSB/DST- Mono	3	8,0 +/- 3,29%		10,48 +/- 4,14%		6,45 +/- 3,97%	
	FTY720 + CSB/DST	3	11,8 +/- 3,67%		4,93 +/- 2,13%		1,55 +/- 0,4%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 25	Kontrolle	3	18,5 +/- 9,19%		18,73 +/- 9,26%	nicht signifikant	0,64 +/- 0,55%	
	FTY720- Mono	3	10,7 +/- 14,19%		24,62 +/- 9,68%		0,78 +/- 0,68%	
	CSB/DST- Mono	3	46,16 +/- 5,41%		5,32 +/- 1,03%		0,5 +/- 0,11%	
	FTY720 + CSB/DST	3	36,01 +/- 9,36%		13,51 +/- 0,22%		0,66 +/- 0,25%	

Tabellen 9: Proliferationsverhalten injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in RAG2^{-/-}-Mäusen, ohne Behandlung, mit FTY720-Monotherapie, CSB-Monotherapie und Kombinationstherapie aus FTY720 und CSB/DST. Analyse an Tag 5. Gate auf Ly5.1-positive Zellen.

* = p < 0,05

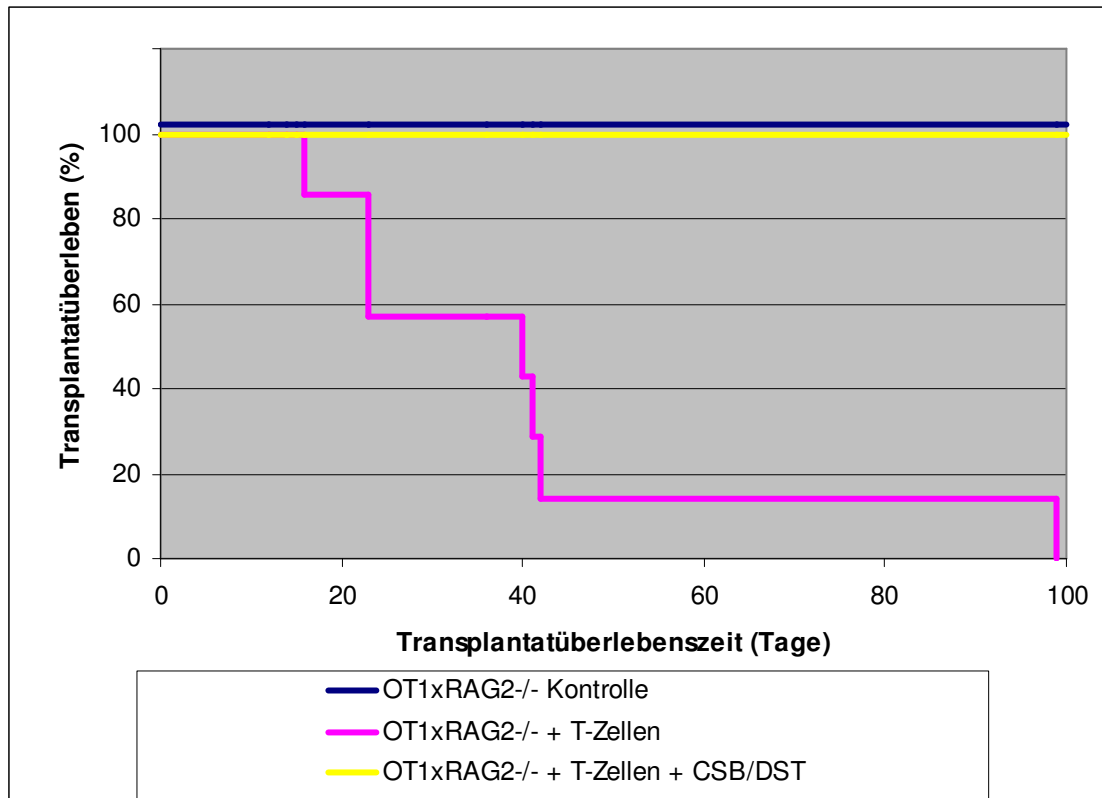
3.7. Toleranzinduktion in OT-1xRAG2^{-/-}-Empfängern

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass mittels FTY720 die homeostatische Proliferation in lymphopenen Empfängern nicht unterdrückt werden kann. Somit konnte diese Barriere zur Toleranzinduktion nicht überwunden werden. Dennoch wurde postuliert, dass transferierte T-Zellen dann der Toleranzinduktion mittels einer Costimulationsblockade und einer donorspezifischen Transfusion zugänglich sind, wenn die homeostatische Proliferation verhindert wird. Dazu wurden OT-1xRAG2^{-/-}- Mäuse zunächst mit T-Zellen rekonstituiert. Am Folgetag wurde dann eine Herztransplantation durchgeführt (Spender: BALB/c). In der Versuchsgruppe wurden zudem zur Costimulationsblockade MR-1 (CSB) und zur donorspezifischen Transfusion donorspezifische Milzzellen (DST) appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich NaCl 0,9%.

In der Versuchsgruppe (CSB/DST) konnte in dem Beobachtungszeitraum von 100 Tagen keine Transplantatabstoßung registriert werden (n=6). Hingegen stieß die Kontrollgruppe ihre Transplantate nach 30,8 +/- 10,4 Tagen ab (n=6). Wurden die Empfänger außer der Transplantation nicht behandelt, so erfolgte ebenfalls keine Abstoßung innerhalb des Beobachtungszeitraums (n=4).

Spender	Empfänger	n	Transplantat- überleben Tage	Durch- schnitt Tage	Signifikanz (T-Test)
BALB/c	OT-1xRAG2 ^{-/-}	4	>100 x 4	> 100	P<0,05
BALB/c	OT-1xRAG2 ^{-/-} + 1*10 ⁷ T-Zellen	6	16, 23, 23, 40, 41, 42	30,8	
BALB/c	OT-1xRAG2 ^{-/-} + 1*10 ⁷ T-Zellen + CSB/DST	6	>100 x 6	> 100	

Tabelle 10: Einfluss der Costimulationsblockade und donorspezifischer Transfusion auf das Transplantatüberleben in OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen nach T-Zell-Applikation



**Abbildung 13: Abszisse: Transplantatüberlebenszeit in Tagen, Ordinate: prozentuales Transplantatüberleben;
Spender BALB/c, Empfänger: OT-1xRAG2^{-/-}.**

3.8. Proliferationsverhalten von Lymphozyten in OT-1xRAG2^{-/-}-Empfängern

Ebenso wie in den RAG2^{-/-}-Tieren wurde das Proliferationsverhalten und das Expressionsmuster der Aktivierungsmarker der transferierten Lymphozyten unter dem Einfluss der Costimulationsblockade in OT-1xRAG2^{-/-} Mäusen untersucht. Dazu wurden CFSE-markierte Milz- und LK-Zellen von Ly5.1-Spendern OT-1xRAG2^{-/-}-Empfängertieren intravenös appliziert. Durch das Oberflächenmolekül Ly5.1 konnten in den späteren Messungen in der Durchflusszytometrie die transferierten Zellen von den Zellen der Empfängertiere (Ly5.2) unterschieden werden. Die Versuchsgruppe erhielt zur Costimulationsblockade MR-1 und eine donorspezifische Transfusion aus Milzzellen von BALB/c-Tieren. Die Kontrollgruppe erhielt NaCl 0,9%. Als zweite Kontrollgruppe fungierten B6-Mäuse, bei denen derselbe Versuchsablauf durchgeführt wurde, also einmal mit Costimulationsblockade und donorspezifischer Transfusion und einmal mit NaCl 0,9%. An Tag fünf wurden die Lymphknoten-Zellen der Empfängertiere per Durchflusszytometrie untersucht, wobei insbesondere die transferierten Ly5.1-Zellen Beachtung fanden. Es erfolgte analog zum zuvor dargestellten Versuch eine Analyse der bereits proliferierten/schnell proliferierten Zellen (Gate R1), der in Proliferation befindlichen Zellen (Gate R2) und der noch nicht proliferierten Zellen (Gate R3) (siehe Abbildung 14 und 15). Jeder Versuch wurde dabei dreimal durchgeführt.

Bei der Analyse aller Ly5.1-Zellen fand sich in keinem der drei Gates ein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe (CSB/DST) und der Kontrollgruppe, wenn als Empfänger OT-1xRAG2^{-/-}-Mäuse verwendet wurden. Auch das Proliferationsverhalten der Ly5.1-T-Zellen (CD3) sowie deren Subpopulationen (CD4 und CD8) zeigten keine signifikanten Unterschiede in Kontroll- und Versuchsgruppe. Dieselben Ergebnisse zeigten sich auch, wenn dieselbe Versuchsanordnung in B6-Mäusen durchgeführt wurde.

Zum Teil signifikante Unterschiede konnten jedoch beobachtet werden, wenn OT-1xRAG2^{-/-}-Tiere mit B6-Mäusen verglichen wurden: So war insbesondere der Anteil der schnell proliferierenden CD4-Lymphozyten in OT-1xRAG2^{-/-}-Empfängern signifikant größer (OT-1xRAG2^{-/-}: CSB/DST-Gruppe: 51,93 +/- 8,99%; Kontrollgruppe: 62,44 +/- 3,24% versus B6: CSB/DST-Gruppe: 0,76 +/- 0,42% bzw. KG: 0,85 +/- 0,71%). Dabei spielte es offensichtlich keinerlei Rolle, ob eine Costimulationsblockade durchgeführt wurde oder nicht.

Weiterhin wurden die Aktivierungsmarker (CD25, CD44, CD45RB, CD62L, CD69, CD122) der Ly5.1 positiven Zellen untersucht: Auch hier konnten weder zwischen OT-1xRAG2^{-/-}-Kontroll- und Versuchsgruppe noch zwischen B6-Versuchs- und Kontrollgruppe

Unterschiede festgestellt werden. Erst beim Vergleich von OT-1xRAG2^{-/-}-Tiere mit B6-Tieren fielen auch hier insbesondere bei den schnell proliferierenden Zellen teilweise signifikante Unterschiede auf, wobei eben so keine Abhängigkeit von einer Costimulationsblockade bzw. donorspezifischen Transfusion zu erkennen waren. Die schnell proliferierten Zellen in OT-1xRAG2^{-/-}-Empfängern wiesen deutlich mehr CD44 positive Zellen auf, als in B6-Tieren (OT-1xRAG2^{-/-}: CSB/DST-Gruppe: 47,1 +/- 9,19%; Kontrollgruppe: 64,8 +/- 8,57 % versus B6: CSB/DST-Gruppe: 6,65 +/- 8,11% bzw. Kontrollgruppe: 6,13 +/- 5,26%). Ein ähnliches Bild fand sich bei CD122 und CD25 mit einer höheren Anzahl an CD122 und CD25 positiven Zellen bei den OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen im Bereich der schnell proliferierten Lymphozyten, als bei den B6-Tieren. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den RAG2^{-/-}-Tieren, konnten keine wesentlichen Unterschiede bei CD62L festgestellt werden. Auch bei CD69 zeigten sich nur dezente Unterschiede.

Bei der Analyse von CD45RB fanden sich bei den OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen im Bereich der noch nicht proliferierten Zellen deutlich weniger Lymphozyten CD45RB positiv, als bei den B6-Tieren.

Insgesamt konnten keine gravierenden Unterschiede bei den langsam proliferierten Zellen beobachtet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es im Gegensatz zu B6-Mäusen in OT-1xRAG2^{-/-}-Tieren trotz voller lymphatischer Kompartimente zu einer signifikant größeren Proliferation der transferierten Zellen gekommen ist. Insbesondere fällt dieses bei den CD4-T-Zellen auf. Weiterhin konnte vor allem bei den schnell proliferierten Zellen im gewissen Rahmen ein erhöhtes Expressionsmuster von Aktivierungsmarkern in den OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen festgestellt werden.

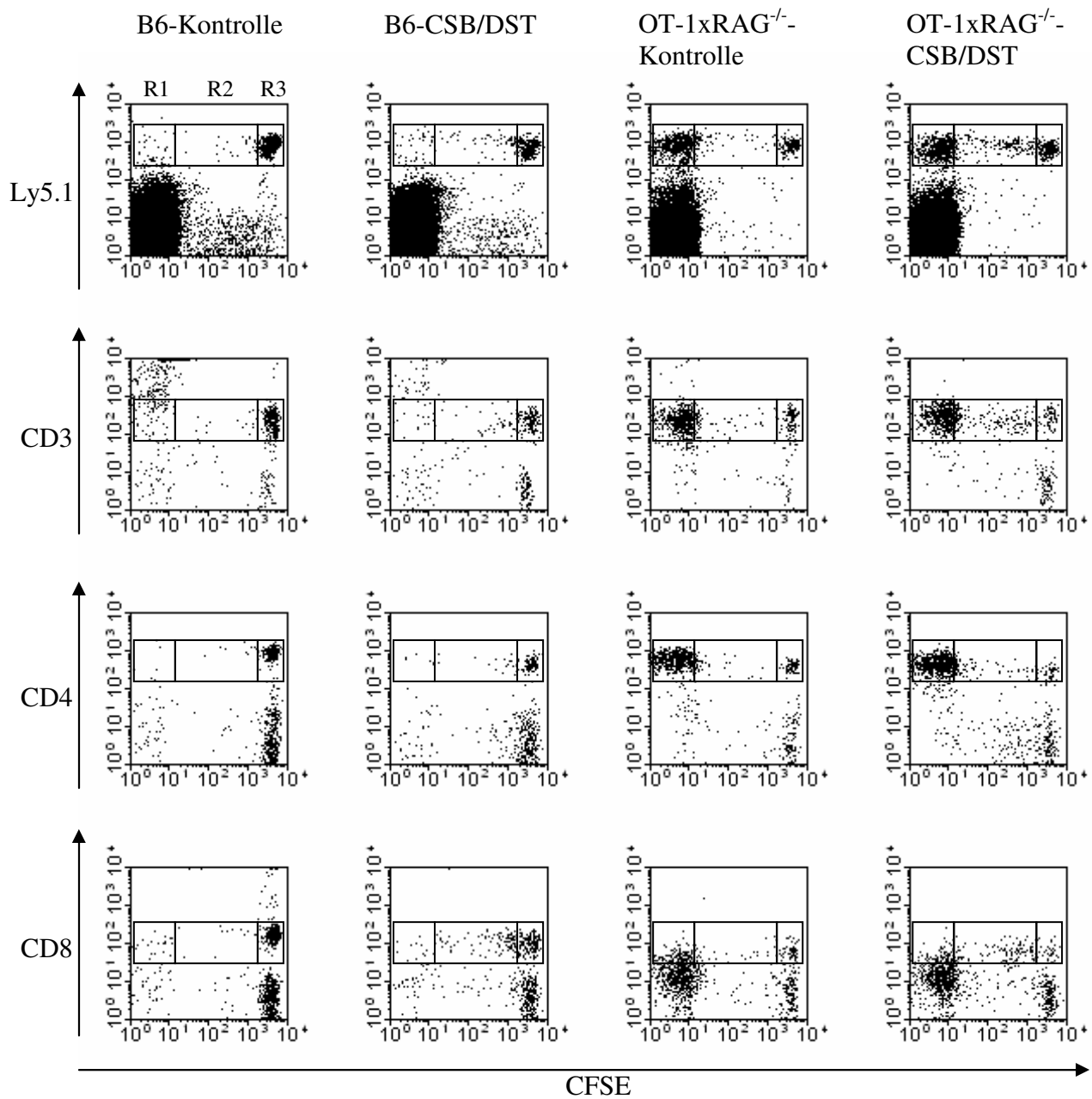
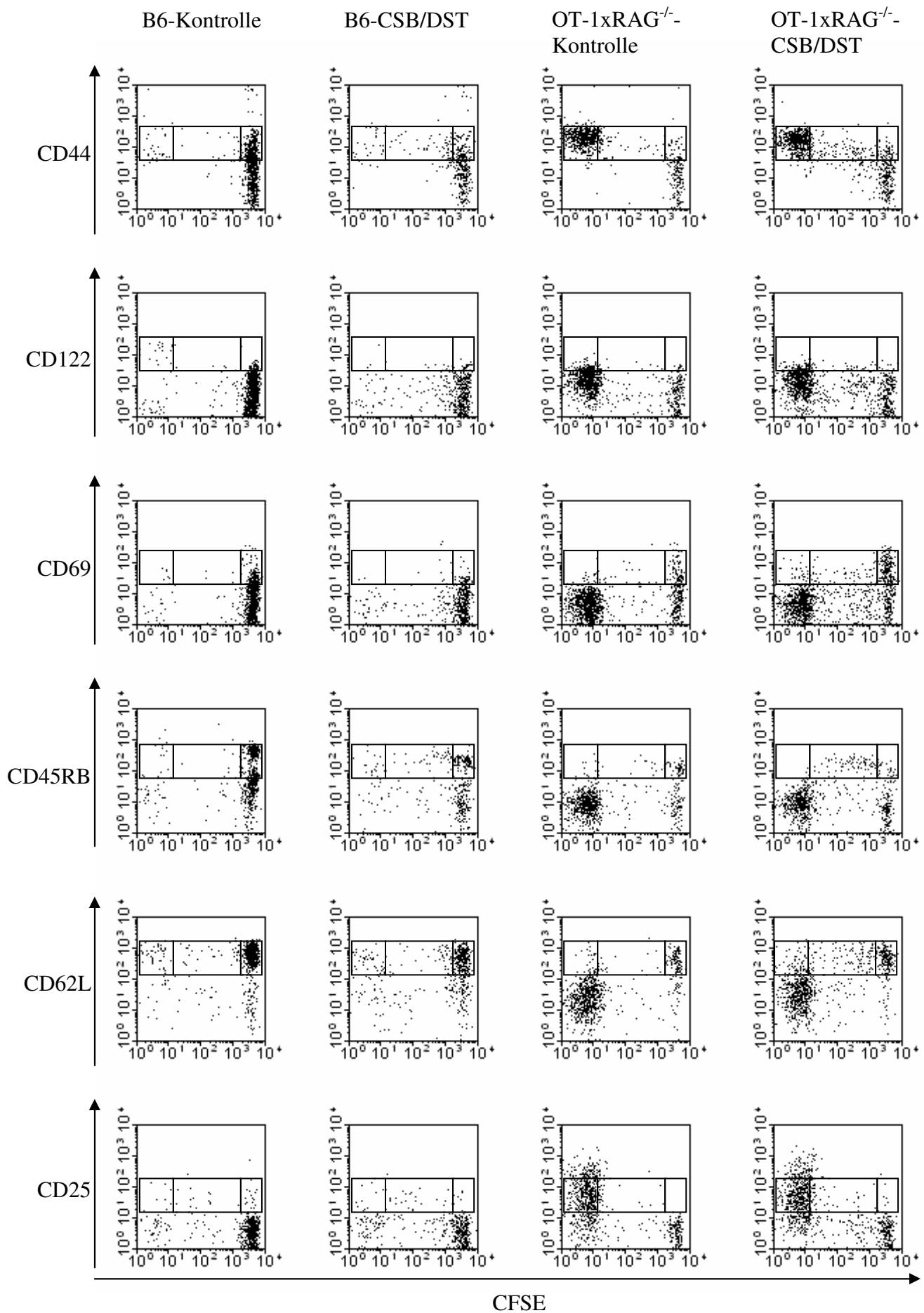


Abbildung 14: Proliferationsverhalten injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in B6- und OT-1xRAG²^{-/-}-Mäusen, jeweils mit und ohne Costimulationsblockade/donorspezifischer Transfusion. Analyse an Tag 5. Berücksichtigt sind nur Ly5.1-positive Zellen.

Abbildung 15 (nächste Seite): Proliferationsverhalten und Expressionsmuster injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in B6- und OT-1xRAG²^{-/-}-Mäusen, jeweils mit und ohne Costimulationsblockade/donorspezifischer Transfusion. Analyse an Tag 5. Berücksichtigt sind nur Ly5.1-positive Zellen.



Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
Ly 5.1	B6 Kontrolle	3	0,09 +/- 0,1%		0,1 +/- 0,0%		0,84 +/- 0,0%	
	B6 + CSB/DST	3	0,1 +/- 0,0%		0,13 +/- 0,01%		0,4 +/- 0,01%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	3,7 +/- 1,52%		0,44 +/- 0,01%		0,87 +/- 0,2%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	3,28 +/- 2,8%		0,75 +/- 0,43%		0,96 +/- 0,03%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 3	B6 Kontrolle	3	55,81 +/- 13,86%		0,43 +/- 0,11%		0,58 +/- 0,05%	
	B6 + CSB/DST	3	48,92 +/- 6,44%		0,3 +/- 0,1%		0,18 +/- 0,05%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	81,56 +/- 10,04%		1,0 +/- 0,19%		0,66 +/- 0,31%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	80,55 +/- 10,36%		1,34 +/- 0,45%		0,35 +/- 0,04%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 4	B6 Kontrolle	3	0,85 +/- 0,71%		7,44 +/- 3,21%		28,14 +/- 2,34%	
	B6 + CSB/DST	3	0,76 +/- 0,42%		11,26 +/- 1,53%		8,4 +/- 0,6%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	62,44 +/- 3,24%		6,39 +/- 1,55%		5,76 +/- 1,86%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	51,93 +/- 8,99%		7,14 +/- 1,82%		3,62 +/- 1,3%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 8	B6 Kontrolle	3	6,15 +/- 5,65%	nicht signifikant	13,69 +/- 4,27%		15,78 +/- 6,01%	
	B6 + CSB/DST	3	2,97 +/- 3,97%		28,46 +/- 12,49%		5,84 +/- 2,72%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	11,21 +/- 6,73%		6,3 +/- 2,08%		4,64 +/- 1,69%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	9,9 +/- 8,16%		10,35 +/- 2,82%		2,11 +/- 0,79%	

Tabellen 11: Proliferationsverhalten injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in B6- und OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen, jeweils mit und ohne Costimulationsblockade/donorspezifischer Transfusion. Analyse an Tag 5. Berücksichtigt sind nur Ly5.1-positive Zellen.

* = p < 0,05

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 44	B6 Kontrolle	3	6,13 +/- 5,26%		11,29 +/- 4,64%	nicht signifikant	11,04 +/- 6,83%	nicht signifikant
	B6 + CSB/DST	3	6,65 +/- 8,11%		23,52 +/- 12,9%		4,89 +/- 3,83%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	64,8 +/- 8,57%		7,93 +/- 3,36%		1,72 +/- 1,08%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	47,1 +/- 9,2%		8,36 +/- 2,22%		1,77 +/- 0,37%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 122	B6 Kontrolle	3	5,69 +/- 2,06%		3,81 +/- 0,96%	*	20,04 +/- 17,44%	
	B6 + CSB/DST	3	3,31 +/- 4,29%		11,32 +/- 1,36%		6,67 +/- 0,97%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	40,03 +/- 1,4%		5,61 +/- 3,48%		1,44 +/- 0,54%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	36,26 +/- 6,84%		7,08 +/- 2,49%		1,52 +/- 0,61%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 69	B6 Kontrolle	3	1,15 +/- 1,14%	*	5,75 +/- 0,24%	*	18,84 +/- 15,0%	nicht signifikant
	B6 + CSB/DST	3	2,21 +/- 2,82%		11,99 +/- 2,92%		12,63 +/- 9,61%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	6,35 +/- 2,08%		5,75 +/- 0,64%		5,39 +/- 2,44%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	13,96 +/- 14,8%		7,14 +/- 0,88%		6,06 +/- 1,68%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 45RB	B6 Kontrolle	3	1,31 +/- 1,48%	nicht signifikant	7,05 +/- 1,23%	nicht signifikant	15,16 +/- 3,38%	
	B6 + CSB/DST	3	1,22 +/- 1,63%		10,57 +/- 3,31%		4,97 +/- 0,47%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	1,43 +/- 1,46%		4,32 +/- 2,45%		3,01 +/- 0,54%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	0,64 +/- 0,67%		7,92 +/- 3,18%		1,81 +/- 1,01%	

Tabellen 12: Proliferationsverhalten und Expressionsmuster injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in B6- und OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen, jeweils mit und ohne Costimulationsblockade/donorspezifischer Transfusion. Analyse an Tag 5. Berücksichtigt sind nur Ly5.1-positive Zellen.

* = p < 0,05

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 62L	B6 Kontrolle	3	3,49 +/- 0,38%	nicht signifikant	11,11 +/- 4,1%	nicht signifikant	45,095 +/- 5,23%	
	B6 + CSB/DST	3	2,91 +/- 1,4%		17,55 +/- 3,54%		20,52 +/- 9,0%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	5,48 +/- 2,71%		5,69 +/- 2,24%		9,05 +/- 3,65%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	4,85 +/- 4,04%		8,99 +/- 4,68%		6,91 +/- 2,95%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 25	B6 Kontrolle	3	3,29 +/- 2,48%		17,14 +/- 9,43%	nicht signifikant	1,87 +/- 0,41%	
	B6 + CSB/DST	3	1,76 +/- 1,77%		24,03 +/- 18,69%		0,8 +/- 0,59%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	37,11 +/- 3,79%		9,32 +/- 1,7%		0,52 +/- 0,11%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	27,23 +/- 12,65%		9,14 +/- 3,68%		6,14 +/- 9,58%	

Tabellen 12: Proliferationsverhalten und Expressionsmuster injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in B6- und OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen, jeweils mit und ohne Costimulationsblockade/donorspezifischer Transfusion. Analyse an Tag 5. Berücksichtigt sind nur Ly5.1-positive Zellen.

* = p < 0,05

3.9. Proliferationsverhalten von Lymphozyten in OT-1xRAG2^{-/-}-Empfängern nach Herztransplantation

Nachdem das Proliferationsverhalten der transferierten Zellen in OT-1xRAG2^{-/-}-Tieren überprüft wurde, wurde nun untersucht, wie diese Zellen sich im gleichen Versuchsaufbau verhalten, wenn zudem die Empfängermäuse eine Herztransplantation erhielten.

Zunächst wurden dementsprechend CFSE-markierte LK- und Milzzellen von Ly5.1 Spendern in OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen bzw. B6-Mäusen injiziert. Am Folgetag wurde dann jeweils eine Herztransplantation durchgeführt (Spender BALB/c). Die Versuchsgruppe erhielt eine Costimulationsblockade mittels MR-1 und zudem eine donorspezifische Transfusion aus Milzzellen. Der Kontrollgruppe wurde NaCl 0,9% verabreicht. Nach fünf Tagen wurden die Lymphknoten-Zellen via Durchflusszytometrie auf Proliferation und Aktivierungsmarker untersucht. Jeder Versuch wurde jeweils dreimal durchgeführt.

Die Ergebnisse ähnelten den Ergebnissen, die bei demselben Versuch ohne Herztransplantation gefunden wurden. Wieder zeigte sich, dass es in den OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen zu einer signifikant stärkeren Proliferation der schnell proliferierenden Zellen kam, als in den B6-Tieren, wobei wiederum der Einsatz der Costimulationsblockade und donorspezifischen Transfusion keinerlei Einfluss zu besitzen schien (OT-1xRAG2^{-/-}: CSB/DST-Gruppe: 6,32 +/- 3,43%; Kontrollgruppe: 11,43 +/- 7,23% versus B6: CSB/DST-Gruppe: 0,05 +/- 0,04; Kontrollgruppe: 0,06 +/- 0,03%). Auch die Ergebnisse für CD3, CD4 und CD8 waren im Prinzip vergleichbar mit den Vorergebnissen. Allerdings zeigte sich bei der Untersuchung der Lymphozyten, dass bei einer zusätzlichen Herztransplantation der Anteil an schnell proliferierten CD3 positiven Zellen, insbesondere bei den B6-Mäusen deutlich geringer ausfiel, als bei den entsprechenden Versuchen ohne Herztransplantation. Ein dementsprechend höherer Anteil an CD3 positiven Zellen konnte bei den nur langsam proliferierenden Zellen und den noch nicht proliferierten Zellen ausgemacht werden. Außerdem konnte festgestellt werden, dass nach Herztransplantation der Anteil an CD8 positiven Zellen vor allem bei den OT-1xRAG2^{-/-}-Tieren wesentlich höher lag, als ohne Transplantation.

Weiterhin wurden ebenso die Aktivierungsmarker (CD25, CD44, CD45RB, CD62L, CD69, CD122) der Ly5.1 positiven Zellen untersucht: Auch hier zeigte sich, dass weder zwischen OT-1xRAG2^{-/-}-Kontroll- und CSB/DST-Gruppe, noch zwischen B6-CSB/DST- und Kontrollgruppe Unterschiede festgestellt werden konnten. Erst beim Vergleich von OT-1xRAG2^{-/-}-Tiere mit B6-Tieren fielen wieder insbesondere bei den schnell proliferierenden

Zellen teilweise signifikante Unterschiede auf, wobei auch hier keine Abhängigkeit von einer Costimulationsblockade zu erkennen war. Die schnell proliferierten Zellen in OT-1xRAG2^{-/-}-Empfängern wiesen deutlich mehr CD44 positive Zellen auf, als in B6-Tieren (OT-1xRAG2^{-/-}: CSB/DST-Gruppe: 50,07 +/- 20,64%; Kontrollgruppe: 47,76 +/- 31,13% versus B6: DST/CSB-Gruppe: 3,31 +/- 2,16% bzw. Kontrollgruppe: 6,17 +/- 3,74%). Ein ähnliches Bild fand sich bei CD122, CD 45RB, CD 69 und CD25. Keine wesentlichen Unterschiede konnten hier bei CD62L beobachtet werden.

Ein tendenziell gegenläufiges Verhalten zeigte sich bei den jeweiligen Aktivierungsmarkern in der Gruppe der noch nicht proliferierten Zellen, wobei klare Signifikanzen nicht gefunden werden konnten.

Bei den langsam proliferierten Zellen stellte sich heraus, dass bei den B6-Mäusen signifikant mehr CD62L positive Zellen, als bei den OT-1xRAG2^{-/-}-Empfängern zu finden waren (B6: CSB/DST-Gruppe: 12,71 +/- 4,81; Kontrollgruppe: 13,99 +/- 0,99% versus OT-1xRAG2^{-/-}: CSB/DST-Gruppe: 8,37 +/- 3,6%; Kontrollgruppe: 3,88 +/- 0,31%).

Auch nach Herztransplantation kommt es in OT-1xRAG2^{-/-}-Tieren zu einer schnellen Proliferation der transferierten Lymphozyten, wobei neben einer Proliferation der CD4-T-Zellen auch eine starke Proliferation der CD8-T-Zellen beobachtet werden kann. Weiterhin fällt eine stärkere Ausprägung der Aktivierungsmarker bei den Versuchen nach Herztransplantation auf, als dieses ohne eine Transplantation der Fall ist.

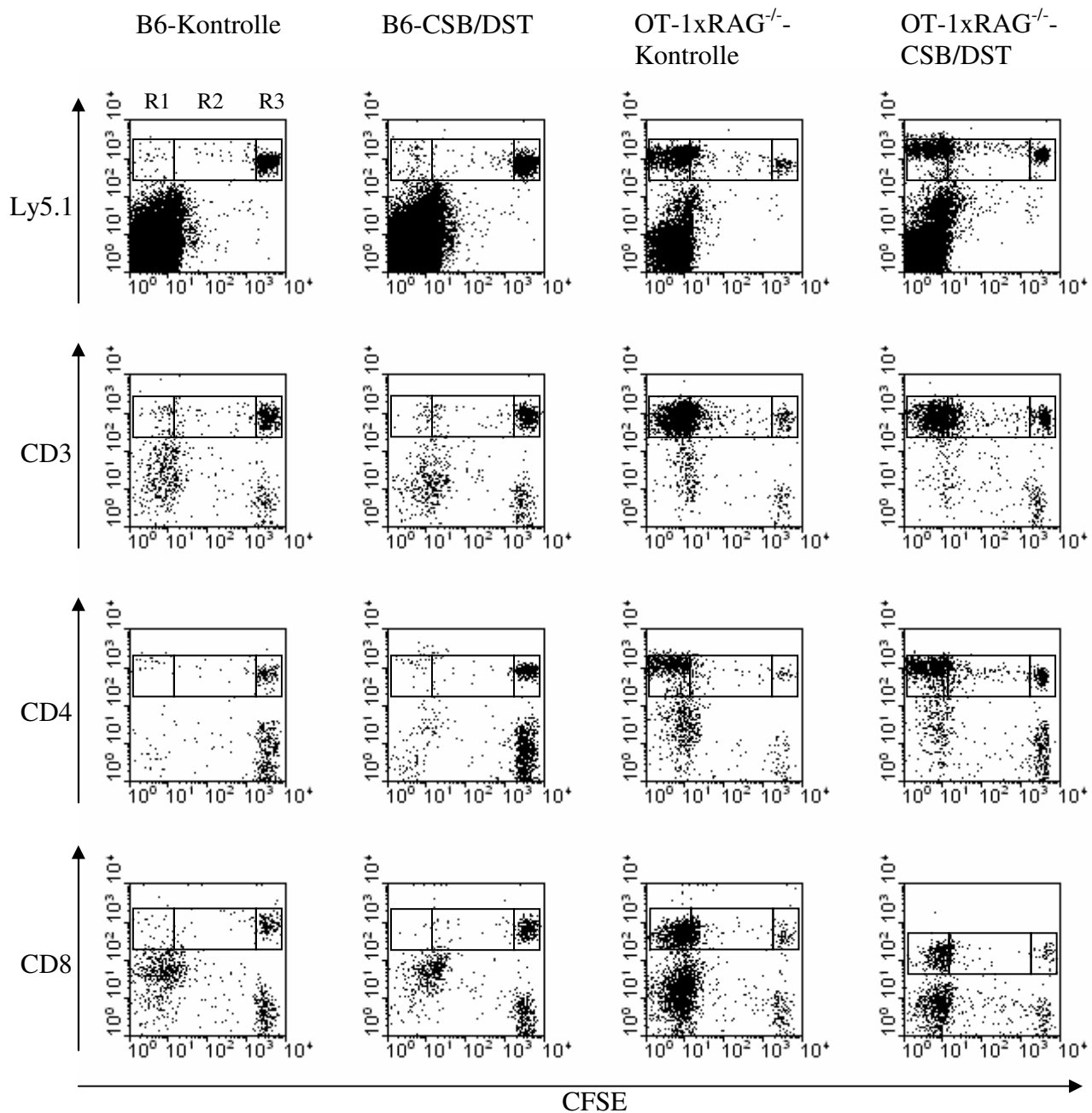
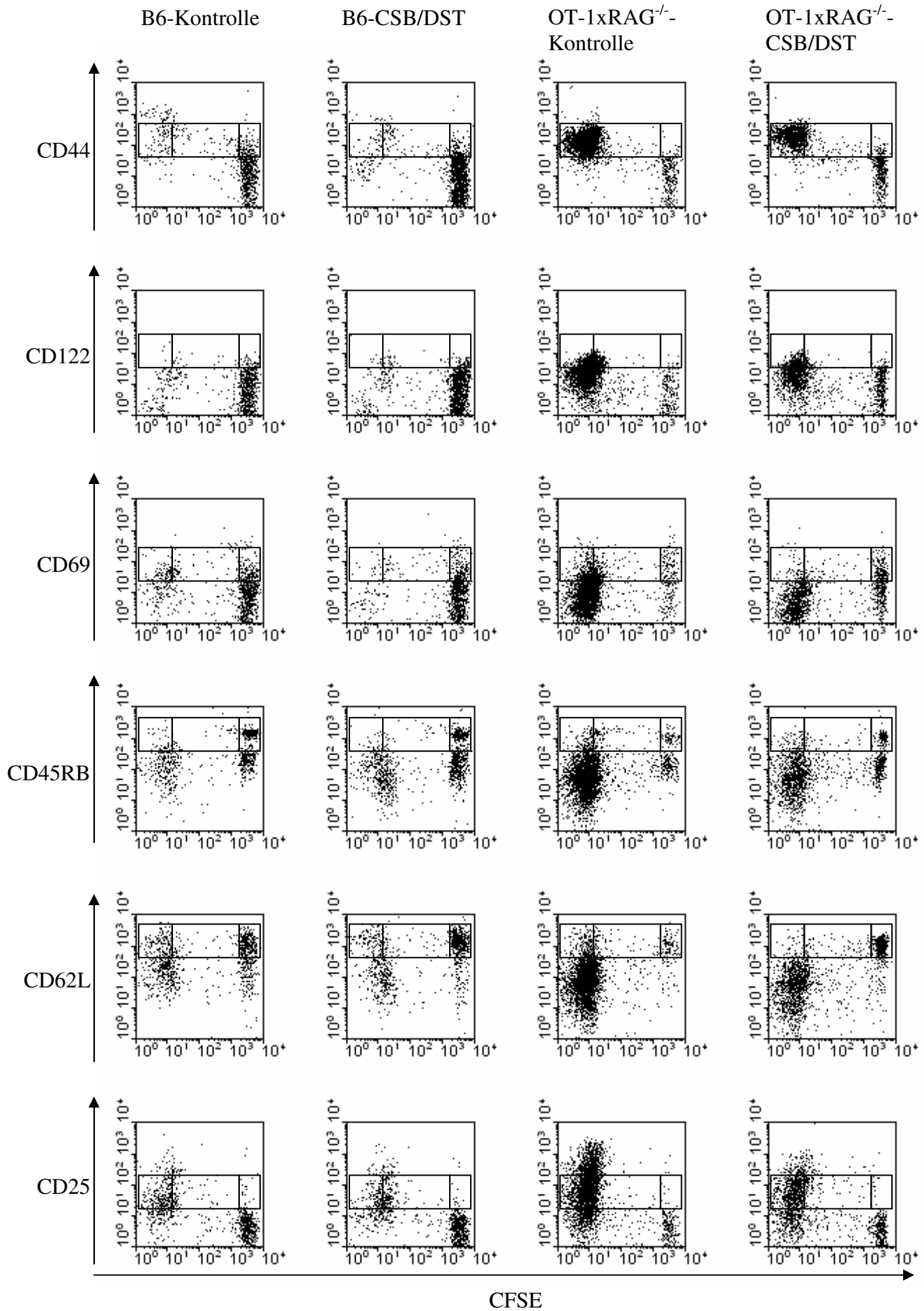


Abbildung 16: Proliferationsverhalten injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in B6- und OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen, jeweils mit und ohne Costimulationsblockade/donorspezifischer Transfusion, jeweils nach Herztransplantation. Analyse an Tag 5. Gate auf Ly5.1-positive Zellen.

Abbildung 17 (nächste Seite): Proliferationsverhalten und Expressionsmuster injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in B6- und OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen, jeweils mit und ohne Costimulationsblockade/donorspezifischer Transfusion, jeweils nach Herztransplantation. Analyse an Tag 5. Gate auf Ly5.1-positive Zellen.



Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
Ly 5.1	B6 Kontrolle	3	0,06 +/- 0,03%	* * *	0,53 +/- 0,04%	* * *	0,45 +/- 0,27%	nicht signifikant
	B6 + CSB/DST	3	0,05 +/- 0,04%		0,04 +/- 0,03%		0,43 +/- 0,21%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	11,43 +/- 7,23%		0,53 +/- 0,37%		1,08 +/- 0,85%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	6,32 +/- 3,43%		0,71 +/- 0,2%		1,12 +/- 1,45%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 3	B6 Kontrolle	3	5,6 +/- 0,67%	* * *	19,58 +/- 7,78%	* * *	11,62 +/- 7,94%	nicht signifikant
	B6 + CSB/DST	3	2,12 +/- 2,47%		18,52 +/- 10,49%		15,9 +/- 11,63%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	63,48 +/- 26,89%		4,12 +/- 3,68%		1,55 +/- 0,9%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	50,24 +/- 36,74%		7,44 +/- 7,78%		3,22 +/- 2,35%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 4	B6 Kontrolle	3	2,26 +/- 1,29%	* * *	11,08 +/- 3,04%	* * *	15,93 +/- 2,51%	* * *
	B6 + CSB/DST	3	1,5 +/- 0,81%		10,28 +/- 2,41%		17,9 +/- 1,04%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	58,27 +/- 15,13%		4,94 +/- 1,65%		2,35 +/- 0,38%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	33,49 +/- 7,73%		9,81 +/- 4,49%		5,75 +/- 0,99%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 8	B6 Kontrolle	3	3,15 +/- 3,0%	* * *	11,73 +/- 1,53%	* * *	6,95 +/- 5,07%	nicht signifikant
	B6 + CSB/DST	3	1,71 +/- 2,65%		9,77 +/- 3,96%		5,13 +/- 5,09%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	39,99 +/- 21,46%		5,38 +/- 2,08%		1,9 +/- 1,0%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	34,87 +/- 24,36%		13,34 +/- 2,08%		3,13 +/- 2,55%	

Tabellen 13: Proliferationsverhalten injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in B6- und OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen, jeweils mit und ohne Costimulationsblockade/donorspezifischer Transfusion, jeweils nach Herztransplantation. Analyse an Tag 5. Berücksichtigt sind nur Ly5.1-positive Zellen.

* = p < 0,05

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 44	B6 Kontrolle	3	6,17 +/- 3,74%	* * * *	16,92 +/- 3,08%	* * * *	2,29 +/- 1,95%	nicht signifikant
	B6 + CSB/DST	3	3,31 +/- 2,16%		13,89 +/- 6,18%		2,65 +/- 1,6%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	47,76 +/- 31,13%		6,29 +/- 1,85%		0,95 +/- 0,62%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	50,07 +/- 20,64%		8,71 +/- 7,91%		11,42 +/- 1,22%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 122	B6 Kontrolle	3	3,17 +/- 2,56%	* * * *	10,66 +/- 5,28%	nicht signifikant	7,57 +/- 4,17%	nicht signifikant
	B6 + CSB/DST	3	2,04 +/- 0,98%		6,95 +/- 1,81%		10,36 +/- 6,1%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	58,6 +/- 8,34%		5,0 +/- 2,58%		2,29 +/- 2,9%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	51,54 +/- 16,02%		11,2 +/- 4,04%		5,28 +/- 5,13%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 69	B6 Kontrolle	3	7,73 +/- 4,04%	* * * *	11,68 +/- 2,31%	* * * *	8,18 +/- 7,03%	* * * *
	B6 + CSB/DST	3	2,64 +/- 0,81%		14,93 +/- 3,9%		10,67 +/- 3,63%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	14,99 +/- 10,04%		5,67 +/- 3,91%		2,77 +/- 2,26%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	15,58 +/- 5,3%		11,19 +/- 1,84%		7,24 +/- 2,85%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi- kanz	Gate 2	Signifi- kanz	Gate 3	Signifi- kanz
CD 45RB	B6 Kontrolle	3	1,51 +/- 0,68%	* * * *	7,82 +/- 4,23%	nicht signifikant	8,18 +/- 5,13%	nicht signifikant
	B6 + CSB/DST	3	0,97 +/- 0,83%		4,51 +/- 2,55%		8,05 +/- 5,69%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	3,89 +/- 1,07%		3,44 +/- 1,26%		1,52 +/- 1,2%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	3,6 +/- 2,08%		8,3 +/- 3,17%		2,91 +/- 2,76%	

Tabellen 14: Proliferationsverhalten und Expressionsmuster injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in B6- und OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen, jeweils mit und ohne Costimulationsblockade/donorspezifischer Transfusion, jeweils nach Herztransplantation. Analyse an Tag 5. Berücksichtigt sind nur Ly5.1-positive Zellen.

* = p < 0,05

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 62L	B6 Kontrolle	3	5,34 +/- 2,58%	nicht signifikant	13,99 +/- 0,99%	* * *	13,59 +/- 6,34%	*
	B6 + CSB/DST	3	4,68 +/- 3,2%		12,71 +/- 4,81%		21,14 +/- 13,35%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	14,31 +/- 9,57%		3,88 +/- 0,31%		2,45 +/- 1,53%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	8,18 +/- 7,0%		8,37 +/- 3,6%		6,63 +/- 5,96%	

Anti-körper	Gruppe	n	Gate 1	Signifi-kanz	Gate 2	Signifi-kanz	Gate 3	Signifi-kanz
CD 25	B6 Kontrolle	3	18,5 +/- 9,19%	* * *	18,73 +/- 9,26%	* * *	0,64 +/- 0,55%	nicht signifikant
	B6 + CSB/DST	3	10,7 +/- 14,19%		24,62 +/- 9,68%		0,78 +/- 0,68%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} Kontrolle	3	45,1 +/- 4,24%		6,02 +/- 1,42%		0,61 +/- 0,21%	
	OT-1xRAG2 ^{-/-} + CSB/DST	3	38,34 +/- 7,77%		12,72 +/- 1,36%		0,48 +/- 0,35%	

Tabellen 14: Proliferationsverhalten und Expressionsmuster injizierter Lymphozyten nach CFSE-Markierung in B6- und OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen, jeweils mit und ohne Costimulationsblockade/donorspezifischer Transfusion, jeweils nach Herztransplantation. Analyse an Tag 5. Berücksichtigt sind nur Ly5.1-positive Zellen.

* = p < 0,05

3.10. FTY720-Einfluß in CCR7^{-/-}-Mäusen nach Toleranzinduktionsprotokoll

In unveröffentlichten Voruntersuchungen der AG Hoffmann konnte bei CCR7^{-/-}-Mäusen eine Costimulationsblockade plus donorspezifischer Transfusion das Transplantatüberleben im Vergleich zu CCR7^{-/-}-Empfängern ohne eine solche Behandlung nicht signifikant verlängern.

Da FTY720 in Kombination mit einer donorspezifischen Transfusion und Costimulationsblockade in der Lage ist, die Zeit bis zur Transplantatabstoßung in RAG2^{-/-}-Tieren zu vergrößern, wurde nun untersucht, ob dieselbe Konstellation auch in der Lage ist, in CCR7^{-/-}-Mäusen das Transplantatüberleben zu verlängern.

Dazu wurden BALB/c-Herzen in CCR7^{-/-}-Mäuse transplantiert. Zudem erhielten sie eine Costimulationsblockade mittels MR-1 und eine donorspezifische Transfusion (DST) von $4 \cdot 10^7$ Milzzellen. Die Versuchsgruppe wurde in den ersten 14 postoperativen Tagen täglich mit 1mg/kg KG FTY720 behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt dagegen NaCl 0,9%.

Die Herzen der Versuchsgruppe wurde im Mittel nach 26,7 +/- 4,2 Tagen abgestoßen (n=9). Ähnlich zeigte sich das Verhalten in der Kontrollgruppe. Hier fand eine Abstoßung nach 25,0 +/- 3,5 Tagen statt (n=6).

FTY720 hat demnach keinen Einfluss auf das Transplantatüberleben in CCR7^{-/-}-Mäusen, die ein Toleranzinduktionsmodell erhalten haben (p= 0,439 T-Test).

Spender	Empfänger	n	Transplantat- überleben Tage	Durch- schnitt Tage	Signifikanz
BALB/c	CCR7 ^{-/-} + DST + MR-1 + FTY720	9	20, 23, 24, 24, 26, 30, 30, 31, 32	26,7	nicht signifikant
BALB/c	CCR7 ^{-/-} + DST + MR-1 + NaCl 0,9%	6	20, 23, 24, 25, 29, 29	25	

Tabelle 15: Auswirkung von FTY720 auf das Überleben von Herztransplantaten in der CCR7^{-/-}-Maus

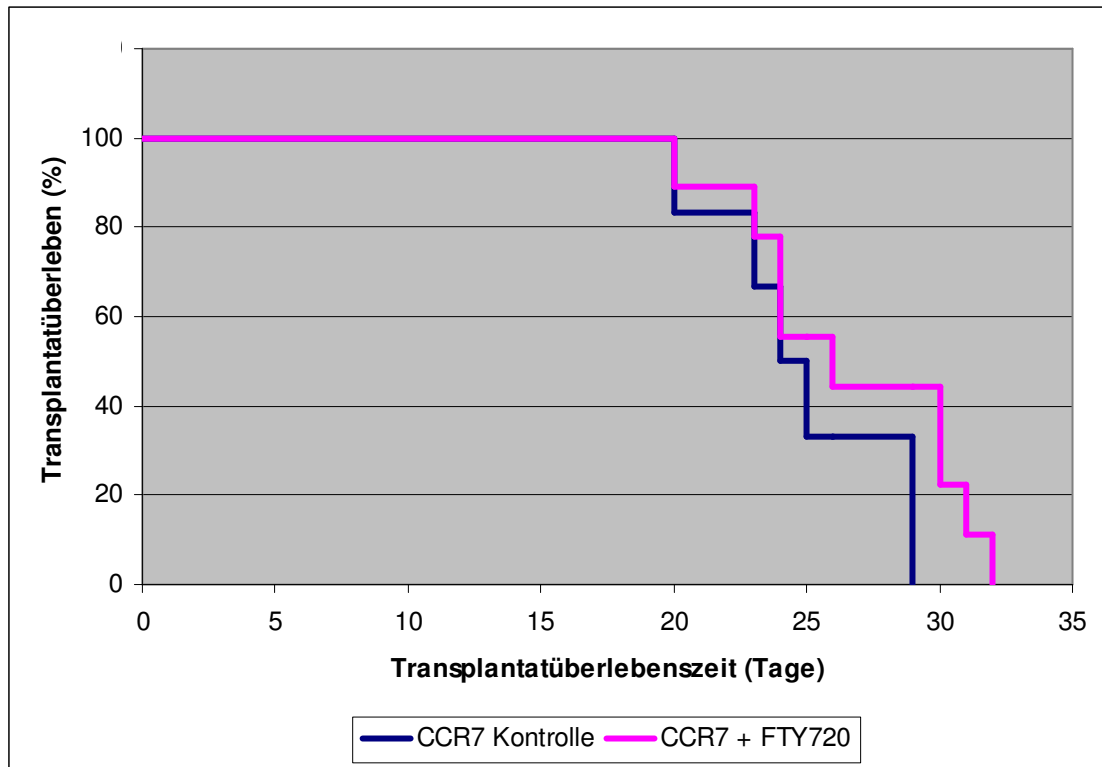


Abbildung 18: Abszisse: Transplantatüberlebenszeit in Tagen, Ordinate: prozentuales Transplantatüberleben;
Spender BALB/c, Empfänger: CCR7^{-/-}

4. Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeiten der Toleranzinduktion in T-Zell-rekonstituierten lymphopenen Empfängern im heterotopen Herztransplantationsmodell in der Maus zu untersuchen.

Um Organtransplantate vor einer Abstoßungsreaktion zu bewahren, werden diverse immunsuppressive Therapieverfahren eingesetzt. Nebenwirkungen der konventionellen immunsuppressiven Verfahren können Zustände der Lymphopenie sein, beispielsweise durch Knochenmarksuppression oder auch antikörpervermittelte Lymphozytendepletion [60-62]. In der Folge kann der Transplantatempfänger leichter Opfer von opportunistischen Infektionen oder Neoplasien werden. Eine Möglichkeit, allgemein immunsuppressive Therapien in der Transplantationsmedizin zu umgehen, könnte in der spezifischen Induktion von peripherer Transplantattoleranz liegen, die beispielsweise durch eine Costimulationsblockade mittels eines nicht depletierenden monoklonalen Antikörpers gegen CD40L oder gegen CTLA4 erreicht werden kann [47-53].

Unter den Bedingungen einer Lymphopenie kommt es als Reaktion der dezimierten Lymphozyten zu einer entsprechenden Proliferation dieser Zellen, um die lymphatischen Kompartimente wieder „aufzufüllen“. Eine Unterform dieser Proliferation, die so genannte homeostatische Proliferation, stellt aber ein Hindernis dar, um in lymphopenen Transplantatempfängern konventionelle Toleranzinduktionsprotokolle erfolgreich anwenden zu können. Folglich wurde postuliert, dass durch eine Unterdrückung der homeostatischen Proliferation lymphopene Empfänger wieder der Induktion von peripherer Transplantattoleranz zugänglich sein sollten.

Eine erfolgreiche Toleranzinduktion in T-Zell-rekonstituierten lymphopenen Tieren könnte somit zum einen die Grundlage für diverse weiterführende Untersuchungen sein, um beispielsweise das Verhalten von T-Zell-Subpopulationen genauer verstehen zu können. Zum anderen kommt es auch in klinischen Situationen nach Organtransplantation immer wieder zu lymphopenen Zuständen. Auch hier könnte die Möglichkeit einer entsprechenden Toleranzinduktion während der homeostatischen Proliferationsphase hilfreich sein.

4.1. T-Zell-Konzentration

In lymphopenen Empfängern, wie beispielsweise nach T-Zell-Depletion oder auch in RAG2^{-/-}- bzw. SCID-Mäusen kommt es nach T-Zell-Transfer zur Proliferation dieser Zellen. In den eigenen Untersuchungen wurden durchweg RAG2^{-/-}-Mäuse als Transplantatempfänger genutzt. Um in diesem Modell Möglichkeiten und Mechanismen der Toleranzinduktion zu untersuchen, galt es zunächst zu ermitteln, wie viele T-Zellen in unserem Modell transferiert werden müssen, um eine Abstoßung in einem reproduzierbaren Zeitfenster zu erhalten. Darüber hinaus sollte die Zeit bis zur Abstoßung möglichst der von Wildtypempfängern gleichen.

In den eigenen Untersuchungen führten $1 \cdot 10^7$ T-Zellen zu den stabilsten und kürzesten Abstoßungszeiten (18,3 Tage). Wu *et al.* führten ähnliche Versuche durch, jedoch verwandten sie als Empfänger SCID-Mäuse. Bei ihnen führten schon $2 \cdot 10^6$ T-Zellen zu einer Abstoßung im vergleichbaren Zeitfenster [57]. In dem vom Autor gewählten Mausmodell musste die benötigte Zellmenge also etwa fünfmal so groß sein, um ähnliche Ergebnisse zu erzielen, wie bei den Versuchen von Wu. Es zeigt sich, dass offensichtlich in verschiedenen Mausmodellen unterschiedliche Bedingungen für die Entstehung eines entsprechend „suffizienten Immunsystems“ vorliegen müssen.

Weiterhin haben Wu *et al.* auch $5 \cdot 10^6$ und $1 \cdot 10^7$ Zellen transferiert. Bei dieser Menge konnte jedoch keine signifikant schnellere Abstoßung der Herztransplantate festgestellt werden, als bei $2 \cdot 10^6$ Zellen. Ein Zeitfenster in der Größenordnung von ca. 18 bis 20 Tagen ist also erforderlich, bis eine ausreichende Proliferation der transferierten T-Zellen stattgefunden hat, um zu einer Abstoßungsreaktion zu führen.

Allein die Zahl der transferierten Lymphozyten ist also nicht entscheidend, offenbar benötigen die Zellen auch noch eine zusätzliche Zeit, um sich funktionell zu entwickeln und erfolgreich ein transplantiertes Organ angreifen zu können. Allerdings weisen Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Chalasani darauf hin, dass homeostatisch proliferierte T-Zellen Herztransplantate nur suboptimal abstoßen können [97]. Sie schreiben den Memory-like-Zellen nach homeostatischer Proliferation einen funktionell nur intermediär wirkenden Charakter zu, wenn man sie mit den funktionellen Eigenschaften naiver Lymphozyten oder klassischer Gedächtniszellen vergleicht. Insofern benötigen diese Zellen offenbar zur erfolgreichen Abstoßung mehr Zeit, als Lymphozyten im Wildtyp.

Weiterhin spielt vermutlich auch der Grad der anatomischen Entwicklung der sekundären lymphatischen Organe eine wichtige Voraussetzung, damit T-Zellen aktiviert werden und schließlich ein Transplantat erfolgreich abstoßen können. Ninova *et al.* konnten zeigen, dass es in lymphopenen Empfängern nach Lymphozytentransfer bis zu 20 Tage dauert, ehe sich beispielsweise eine typische Milzarchitektur bildet [42].

Zusammenfassend weisen also sowohl die eigenen Untersuchungen, als auch die erwähnten Ergebnisse aus der Literatur darauf hin, dass eine Mindestzeit von ca. 18 Tagen in T-Zell-rekonstituierten lymphopenen Empfängern zur Transplantatabstoßung nicht unterschritten werden kann und somit kein exakt gleiches Zeitfenster zur Abstoßung erzielt werden kann, wie beim Wildtyp.

In den eigenen Versuchen wurden schließlich aufgrund der gemachten Ergebnisse durchweg $1 \cdot 10^7$ T-Zellen zur Rekonstitution den RAG2^{-/-}- bzw. der OT-1xRAG2^{-/-}-Mäuse transferiert.

4.2. FTY720-Einfluß in T-Zell-rekonstituierten RAG2^{-/-}-Mäusen nach Toleranzinduktionsprotokoll

Die Arbeitsgruppe um Wu konnte zeigen, dass lymphopene Empfängertiere, die mit T-Zellen rekonstituiert wurden, nicht der konventionellen Toleranzinduktion zugänglich sind. In ihrem Modell wurden SCID Mäuse verwandt. Zur Costimulationsblockade verabreichten sie CTLA-4 und führten eine donorspezifische Transfusion mit donorspezifischen Milzzellen durch. Das Versagen dieses Toleranzinduktionsprotokolls führten sie auf die homeostatische Proliferation zurück, die als Reaktion auf die Lymphopenie stattfand [57].

Zunächst konnten in den eigenen Untersuchungen diese Ergebnisse in einem ähnlichen Modell reproduziert werden. Als Empfängertiere fungierten RAG2^{-/-}-Mäuse, die am Tag vor der Transplantation mit T-Zellen rekonstituiert wurden. Parallel zur Herztransplantation erfolgte die Costimulationsblockade durch den monoklonalen anti-CD40L-Antikörper MR-1. Zudem wurde eine donorspezifische Transfusion mit Milzzellen durchgeführt.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde nun untersucht, ob eine zusätzliche Gabe des Immunmodulators FTY720 möglicherweise die transferierten Lymphozyten der Toleranzinduktion wieder zugänglich machen kann. Yan *et al.* konnten nämlich zeigen, dass FTY720 in Kombination mit einer Costimulationsblockade effektiv eine Abstoßung von Dünndarmtransplantaten in der Maus verhindern kann, was im Rahmen einer alleinigen Costimulationsblockadetherapie nicht möglich war [56].

Entsprechend dieser theoretischen Überlegungen und Erwartungen konnte auch ein signifikant längeres Transplantatüberleben bei den Tieren beobachtet werden, die zur Organprotektion eine Kombination aus FTY720-Gabe und einer Applikation von MR-1 plus DST erhalten hatten. Eine komplette Toleranz des transplantierten Organs ließ sich aber auch mit diesem Regime nicht induzieren.

Da durch die Kombinationstherapie das Transplantatüberleben gesteigert werden konnte, wurde entsprechend mittels der Durchflusszytometrie das Proliferationsverhalten der transferierten Lymphozyten unter dem Einfluss von FTY720 und der Costimulationsblockade plus donorspezifischer Transfusion untersucht. Hiermit galt es die Vorstellung zu prüfen, dass eine entsprechende Behandlung mittels FTY720 die homeostatische Proliferation unterbrechen kann und somit das verlängerte Transplantatüberleben als Effekt der nun greifenden Costimulationsblockade angesehen werden kann. Diese Hypothese unterstützen auch Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Neujahr, die in einem ähnlichen Modell zeigen

konnten, dass durch eine Blockade der homeostatischen Proliferation eine Toleranzinduktion wieder möglich ist. Allerdings verhinderten sie eine homeostatische Proliferation, indem sie die nicht depletierende monoklonalen CD4- und CD8-Antikörper YTS177 und YTS105 einsetzten [98].

Jedoch zeigten die eigenen Experimente, dass FTY720 allein keinerlei signifikanten Effekte auf das Proliferationsverhalten von Lymphozyten zu besitzen scheint. Dies haben auch Untersuchungen von Pinschewer *et al.* gezeigt [81]. Eben so wenig beeinflusst auch FTY720 das Expressionsmuster der proliferierten Zellen. Somit muss zunächst einmal also die Hypothese verworfen werden, dass das verlängerte Transplantatüberleben Ergebnis eines hemmenden Einflusses von FTY720 auf die Proliferation ist.

Ferner zeigten die Untersuchungen mittels der Durchflusszytometrie, dass jedoch Unterschiede in der Zellproliferation und, wenn auch gering ausgeprägt, in dem Expressionsmuster von Aktivierungsmarkern der Zellen beobachtet werden konnten, wenn eine Behandlung mit MR-1 und DST durchgeführt wurde, wobei es keinen Unterschied machte, ob die Behandlung in Kombination mit FTY720 erfolgte.

Interessanterweise steigerte sogar die Applikation von MR-1 und DST die schnelle Proliferation von CD8-T-Zellen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe oder der FTY720-Monotherapie-Gruppe. Diese Beobachtung ging mit einer entsprechenden Abnahme der Zellzahlen bei den noch nicht proliferierten Lymphozyten einher. Nur auf die langsam proliferierenden Zellen konnte auch hier kein Effekt nachgewiesen werden.

Eher gegenteilige Ergebnisse konnten jedoch bei den CD4-T-Zellen beobachtet werden. Hier war die Zahl der schnell proliferierten Zellen deutlich geringer, als bei der Kontrollgruppe. Ebenso war aber auch die Zellzahl bei den noch nicht proliferierten Zellen in dieser Gruppe kleiner. Bei den langsam proliferierenden Zellen waren zumindest auch unter der Kombinationstherapie signifikant weniger Zellen zu registrieren, als in den anderen Gruppen. Unter einer Costimulationsblockade scheint sich also das Proliferationsverhalten der CD4- und CD8-T-Zellen zu Gunsten der CD8-T-Zellen umzukehren.

Einen entscheidenden Anteil an dem verlängerten Transplantatüberleben unter der Kombinationstherapie mit FTY720, Costimulationsblockade und donorspezifischer Transfusion könnten vor allem so genannte regulatorische suppressive T-Zellen (Treg) haben. Die Arbeitsgruppe um Neujahr konnte die Bedeutung von Tregs im lymphopenen Empfänger zeigen [98]. Dazu wurden B6-Mäusen depletierende Antikörper appliziert. In der Folge wurde

bei den nun lymphopenen Tieren eine Herztransplantation durchgeführt. Ebenfalls erfolgte eine Behandlung mit einer Costimulationsblockade und einer donorspezifischen Transfusion. Auch in diesem Modell konnte aufgrund der homeostatischen Proliferation zunächst keine Toleranz induziert werden. Insofern deckten sich auch diese Ergebnisse mit denen von Wu einerseits und denen vom Autor andererseits. Neujahr konnte aber die Resistenz gegen ein Transplantatlangzeitüberleben durchbrechen, indem regulatorische T-Zellen appliziert wurden.

Die am besten untersuchten regulatorischen Zellen sind die natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (Treg). Diese werden im Thymus gebildet und haben beispielsweise in der Maus einen Anteil von 5-10% der peripheren T-Zellen [99]. Dabei repräsentiert der Transkriptionsfaktor Foxp3 einen einzigartigen Marker bezüglich der Entwicklung und Funktion der Treg und wird spezifisch in CD4⁺CD25⁺-Suppressor-T-Zellen exprimiert [100-102].

Neben diesen natürlich vorkommenden Tregs gibt es ferner Hinweise für die extrathymische Entwicklung von CD4⁺CD25⁺-T-Zellen und damit für einen alternativen Weg der *de-novo*-Bildung von Tregs in der Peripherie [103]. Die Entwicklung der peripheren regulatorischen T-Zellen geschieht vor allem in den Lymphknoten, wobei die Architektur des lymphatischen Gewebes eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Differenzierung dieser Zellen spielt [104].

Diese Population von suppressorischen T-Zellen scheint eine essentielle schützende Rolle während der Toleranzinduktion zu spielen, da die Anwesenheit von Treg in transplantierten Empfängern eng mit einem unbestimmten Transplantatüberleben assoziiert ist [105]. Andererseits führt das Entfernen von regulatorischen CD4⁺CD25⁺-T-Zellen zu einer gesteigerten Produktion von Alloantikörpern und schließlich zur Transplantatabstoßung [106]. Die Arbeitsgruppe um Ochando hat in ihren Experimenten das Verhalten und die Bedeutung dieser regulatorischen T-Zellen genauer untersucht. Zunächst behandelten sie herztransplantierte Mäuse mit einer Costimulationsblockade, beispielsweise mittels eines anti-CD40Liganden. Zudem verabreichten sie einen anti-CD62L-Antikörper. Dies führte in der Folge zu einem Verlust des transplantierten Organs. Dieses Abstoßungsverhalten konnten durch eine zusätzliche Gabe von FTY720 wieder aufgehoben werden, so dass erneut eine Toleranz induziert werden konnte [107]. Mittels des antiCD62L-Antikörpers wurde also zunächst das Homing der Lymphozyten verhindert. Dieses traf auch für die regulatorischen T-Zellen zu. Durch die Applikation von FTY720 wurde schließlich wieder ein alternativer Homingmechanismus geschaffen. In Bezug auf die eigenen Untersuchungen bedeutet das,

dass das verlängerte Transplantatüberleben unter Behandlung mit FTY720-Monotherapie oder Kombinationstherapie mit Costimulationblockade, weniger darin besteht, dass alloreaktive Lymphozyten am Verlassen der Lymphknoten gehindert werden, als dass vielmehr die Lymphozyten - insbesondere auch die regulatorischen Lymphozyten - leichter die Lymphknoten betreten können.

Außerdem beschreibt Ochando, dass eine Behandlung mit einer Costimulationsblockade mit einer Expansion der CD4⁺CD25⁺-T-Zellen assoziiert ist. Allerdings ist eine signifikante Zunahme dieser Zellen erst um den 30. Tag zu beobachten [107]. Diese Ergebnisse erklären, dass bei den eigenen Untersuchungen in der Durchflusszytometrie an Tag 5 der Anteil an CD4-T-Zellen entsprechend niedrig ist und eine entsprechende Beurteilung etwaiger regulatorischer T-Zellen noch nicht möglich ist.

Zur Interpretation der Ergebnisse können ferner auch Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Zhang beitragen: Sie transferierten Mäusen *in vitro* stimulierte T-Zellen, warteten vier Wochen, so dass nahezu nur noch Memoryzellen im Organismus zu finden waren. Dann führten sie eine Herztransplantation und ein vergleichbares Behandlungsregime mit FTY720-Gabe sowie Costimulationsblockade und einer donorspezifischen Transfusion in denselben Versuchskombinationen durch, wie vom Autor beschrieben [86]. Da bei Zhang Memory-Zellen näher untersucht wurden, haben diese Ergebnisse ggf. auch Bedeutung für die eigenen Untersuchungen, bei denen ja, bedingt durch die homeostatische Proliferation, Memory-like-Zellen von Interesse sind. So konnte Zhang zunächst zeigen, dass CD4-T-Memory-Zellen durch FTY720 ebenso in sekundären lymphatischen Organen sequestriert werden, wie alloreaktive Effektor-T-Zellen. Allerdings scheint für die alloreaktiven Zellen dieser Sachverhalt nur zu stimmen, wenn die Aktivierung unter einer laufenden FTY720-Behandlung erfolgt [108]. Präexistente Effektor-CD4-T-Zellen werden jedoch nicht signifikant von FTY720 beeinflusst [109]. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit für FTY720-induzierte Sequestration ist offensichtlich durch verschiedene Faktoren bestimmt. Die Möglichkeit von FTY720 T-Zellen in lymphatischen Organen zu halten, hängt von den Homing-Eigenschaften dieser Zellen ab. So konnte gezeigt werden, dass Effektor-CD4-T-Zellen eine begrenzte Fähigkeit besitzen, in lymphatische Organe zu migrieren, wahrscheinlich auf Grund der niedrigen Expression den Homingrezeptoren CD62L und CCR7 [110]. Im Gegensatz dazu können signifikante Mengen von Memory-T-Zellen und womöglich auch Memory-like-Zellen diese Moleküle wieder bilden und so die lymphatischen Organe erneut betreten, was eine gesteigerte Empfindlichkeit für die Effekte von FTY720 zur

Folge hat. Zwar konnte in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass gerade in der Kombinationstherapie aus FTY720 und CSB/DST signifikant mehr Zellen CD62L positiv waren, als beispielsweise in der Kontrollgruppe. Allerdings traf dieses in erster Linie für die schnell proliferierte Zellfraktion zu. Bei diesen Zellen handelt es sich aber definitionsgemäß nicht um Memory-Zellen.

Darüber hinaus konnten Zhang *et al.* zeigen, dass selbst Memory-CD4-T-Zellen nicht gleich auf eine FTY720-Behandlung reagieren. Dies liegt darin begründet, dass sogar Memory-CD4-T-Zellen eine heterogene Gruppe sind, basierend auf verschiedenen Rezirkulationsmustern und funktionellen Eigenschaften. So gibt es einerseits Memory-CD4-T-Zellen, die große Mengen von CD62L und CCR7 exprimieren und in lymphatischen Geweben zu finden sind. Andererseits gibt es aber auch CD62^{low}- und CCR7^{low}-Memory-T-Zellen, die sich vorzugsweise in nichtlymphatischen peripheren Geweben aufhalten und der Überwachung von Pathogenen dienen. Diese Subpopulationen werden zum einen als „zentrale“ und zum anderen als „Effektor“-Memory-Zellen beschrieben. Wenn die Empfindlichkeit des Effektes von FTY720 von dem Migrationsverhalten der T-Zellen abhängt, ist es durchaus möglich, dass FTY720 selektiv nur auf „zentrale“ Memory-T-Zellen und nicht auf „Effektor“-T-Zellen wirkt [111]. Übertragen auf die eigenen Experimente wäre es also durchaus denkbar, dass auch hier Memory-like-T-Zellen den Effekten von FTY720 entgehen und so als „Effektor“-Zellen schließlich zur Transplantatabstoßung beitragen.

Nicht nur die funktionellen Eigenschaften der Lymphozyten spielen eine maßgebliche Rolle bei der Toleranzinduktion. Auch eine entsprechende Anatomie der sekundär lymphatischen Organe ist Voraussetzung für die Induktion peripherer Transplantattoleranz.

So beschreiben Ochando *et al.*, dass für die Induktion von Transplantatlangzeitüberleben eine intakte Architektur des lymphatischen Gewebes unerlässlich ist und dass dieses bei einer Behandlung mit einer Costimulationsblockade mit einer Expansion der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen assoziiert ist. Dieses ist allerdings erst um den 30. Tag zu beobachten [107]. Dazu passend berichtet die Arbeitsgruppe um Ninova ferner, dass es in T-Zell-rekonstituierten Tieren ebenfalls bis zu 30 Tagen dauert, bis eine normale Architektur der Lymphknoten hergestellt ist [42].

In den eigenen Untersuchungen ist bei den RAG2^{-/-}-Mäusen davon auszugehen, dass zum Zeitpunkt der Transplantation noch keine intakte Lymphknotenarchitektur vorhanden ist. Es ist aber gut vorstellbar, dass es auch in unseren Versuchstieren nach der T-Zell-Rekonstitution einer ähnlich langen Periode bedarf, bis sich eine entsprechende Anatomie formiert hat.

Möglicherweise ergibt sich nun aus der Kombinationstherapie von FTY720 und Costimulationsblockade plus donorspezifischer Transfusion ein synergistischer Effekt, der in der Lage ist, dieses Zeitfenster von circa 30 Tagen zu überbrücken. So wäre es möglich, dass sich in dieser Zeit eine entsprechende Anatomie formieren könnte, die es dann regulatorischen T-Zellen ermöglicht, ihre protektive Funktion auszuüben.

Für die zentrale Entwicklung peripherer Toleranz wird schließlich die Apoptose von alloaktivierten T-Zellen beschrieben [112]. In *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass FTY720 in der Lage ist, Apoptose von T-Zellen zu bewirken [113-116]. Diesen Beobachtungen widersprechen jedoch Untersuchungen von Habicht *et al.* Sie konnten unter Verwendung des Apoptosemarkers Annexin V keine Hinweis auf signifikant gesteigerte Apoptosevorgänge in *in-vivo*-Versuchen feststellen[108]. Ebenso scheint diese Sichtweise auch von Böhler *et al.* gesichert worden zu sein [117]. In den eigenen Experimenten wurde auf eine Untersuchung bezüglich einer Apoptose verzichtet. Dies wäre für zukünftige Versuche auf Grund der uneinheitlichen Literaturlage sicherlich noch ein lohnender Ansatzpunkt.

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass durch die Sequestration der transferierten Zellen mittels FTY720 eine deutliche Verbesserung des Transplantatüberlebens in lymphopenen Empfängertieren erreicht werden kann.

4.3. Toleranzinduktion in OT-1xRAG2^{-/-}-Empfängern

Unter der Behandlung mit FTY720 konnte das Ziel nicht erreicht werden, die homeostatische Proliferation zu unterdrücken und damit in lymphopene Empfänger transferierte Lymphozyten wieder einer Toleranzinduktion mittels Costimulationsblockade und donorspezifischer Transfusion zugänglich zu machen. Da die Versuche von Neujahr *et al.* beweisen, dass eine Verlängerung des Transplantatüberlebens durch klassische Toleranzinduktionsprotokolle in lymphopenen Empfängern, die T-Zell-rekonstituiert wurden, möglich ist, wenn die homeostatische Proliferation unterdrückt wird, wurde nach einem entsprechenden Modell gesucht, um diese Überlegungen in der eigenen Arbeitsgruppe zu bestätigen.

Als Empfängertiere wurden hierfür OT-1xRAG2^{-/-}-Mäuse genutzt. Zwar ist in diesen Mäusen eine Lymphopenie im klassischen Sinne nicht vorhanden, dennoch sind diese Tiere als funktionell lymphopen zu betrachten, da die T-Zell-Rezeptoren nur gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind. Nach dem Transfer von Lymphozyten und der Herztransplantation wurden einige der Transplantatempfänger mit einer Costimulationsblockadetherapie mittels MR-1 und einer donorspezifischen Transfusion behandelt. Es konnte schließlich beobachtet werden, dass alle Empfängertiere, die eine Costimulationsblockade und donorspezifische Transfusion erhalten hatten, ihr Transplantat in dem Beobachtungszeitraum von 100 Tagen nicht verloren.

In den durchflusszytometrischen Untersuchungen fiel auf, dass unabhängig von einer Behandlung mittels Costimulationsblockade und donorspezifische Transfusion es in OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen vor allem zu einer schnellen, also spontanen Proliferation der transferierten CD4-T-Zellen gekommen ist. Diese Beobachtung konnte in B6-Tieren nicht gemacht werden. Ferner konnte eine signifikante langsame/homeostatische Proliferation nicht registriert werden. Bei den Ergebnissen spielte es keine Rolle, ob die so rekonstituierten Empfänger zusätzlich einer Herztransplantation unterzogen wurde oder nicht. Abhängig von einer Transplantation zeigte sich aber das Proliferationsverhalten der CD8-T-Zellen. Eine schnelle Proliferation konnte nur unter den Bedingungen einer Transplantation gemacht werden.

Durch diese Untersuchungen konnte zunächst die Hypothese, dass in OT-1xRAG2^{-/-}-Tieren die homeostatische Proliferation suffizient unterdrückt werden kann, bestätigt werden.

Ähnliche Ergebnisse finden sich auch in den Untersuchungen von Min *et al.* [40], die ebenfalls Lymphozyten in OT-1xRAG2^{-/-}-Mäuse transferierten.

Dass es in OT-1xRAG2^{-/-}-Tieren oder auch in B6-Mäusen erst gar nicht zu einer homeostatischen Proliferation kommt, hat mutmaßlich ähnliche Gründe, wie sie auch zur Limitierung einer homeostatischen Proliferation auftreten. So führt vermutlich der direkte T-Zell-T-Zell-Kontakt zum Abbruch einer weiteren Expansion. Aber auch die zunehmende Konkurrenz der IL-7-Rezeptoren um IL-7 verhindert eine weitere Zellteilung. Weiterhin erschweren „volle“ lymphatische Kompartimente den Zugang der T-Zellen zu den antigenpräsentierenden Zellen für die TCR-Selbst-Peptid-MHC-Interaktion und sorgen damit für eine Beendigung der Proliferation [26, 41].

Es stellt sich dennoch die Frage, warum es in OT-1xRAG2^{-/-}-Mäusen trotz „voller“ lymphatischer Kompartimente zu einer schnellen, also spontanen Proliferation kommt, diese Beobachtung im Wildtyp jedoch nicht gemacht werden kann.

Zunächst liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der schnellen Proliferation um eine Antwort auf das transplantierte Herz handeln könnte. Zumindest für die CD8-T-Zellen muss ein solcher Zusammenhang vermutet werden, da bei dieser Zellart nur unter den Bedingungen der Transplantation eine signifikante spontane Proliferation gefunden wird. Im Gegensatz dazu lässt sich bei den CD4-T-Zellen diese Beziehung nicht ohne Weiteres herstellen, da sowohl mit als auch ohne Transplantation eine schnelle Proliferation beobachtet werden kann.

Die schnelle Proliferation, vor allem der CD4-T-Zellen, ist möglicherweise durch unspezifische Antigene erklärbar, mit denen das Immunsystem die Schleimhäute des Respirations- und vor allem des Gastrointestinaltraktes in Kontakt kommt. Bei der Entwicklung des mukosalen Immunsystems, wie beispielsweise dem darmassoziierten Immunsystem (Gut associated lymphatic tissue, GALT), spielen kommensale intestinale Bakterien eine entscheidende Rolle. Es ist berichtet worden, dass keimfreie Mäuse eine reduzierte Zahl von intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und auch eine herabgesetzte Anzahl von Peyerschen Platten (PP) haben [118, 119]. Weiterhin wurde beschrieben, dass die Veränderung des GALT zu einer veränderten oralen Toleranz in keimfreien Mäusen führt [120, 121]. Hingegen zeigen neuere Untersuchungen, dass die T-Zell-vermittelte orale Toleranz in keimfreien Tieren intakt ist [122].

Sind bakterielle Antigene nun in die Induktion physiologischer T-Zell-Proliferation mit einbezogen? Obgleich es gezeigt werden konnte, dass die Abwesenheit der Darmflora die T-

Zell-Proliferation im Rahmen einer Lymphopenie vermindert, bleibt es doch noch unbestimmt, ob die Proliferation von T-Zellen durch Antigene der Darmflora wirklich beeinflusst wird. Strauch *et al.* haben gezeigt, dass intestinale bakterielle Antigene für die Generation und Expansion insbesondere der Tregs entscheidend sind [123]. Gad *et al.* haben berichtet, dass CD25⁻CD4⁺-T-Zellen von konventionellen und keimfreien Mäusen eine enterobakterielle Reaktion zeigten und dass eine solche Reaktion sowohl in konventionellen als auch keimfreien Tieren durch Treg geregelt wird, so dass es nahe liegt, dass gewisse Treg spezifisch für Darmantigene sind [124]. Eine wichtige Studie von Ostman *et al.* berichtet, dass die Anwesenheit einer mikrobiellen Flora die Entwicklung von voll funktionsfähigen Treg-Zellen fördert [125]. Dennoch war ein Mangel von Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺-T-Zellen in keimfreien Mäusen nur in den leberdrainierenden coeliacalen Lymphknoten zu registrieren. Hingegen war die Zahl der Treg in mesenterialen Lymphknoten von keimfreien Tieren erhöht im Vergleich zu konventionellen Mäusen [125]. Booki *et al.* hingegen konnten keine Hinweise dafür finden, dass die Darmflora eine entscheidende Rolle in der Generation, Proliferation oder suppressiven Aktivität von Treg hat. Die Tatsache, dass die Proliferation von diesen Zellen nicht durch eine Blockade der TCR-MHC-Interaktion durch Anti-MHC Klasse II Antikörper unterdrückt werden kann, stützt diese Ergebnisse [126]. Weiterhin konnten Booki zeigen, dass es keinen Unterschied im Grad der Komplexität der CD4-T-Zellen von 7-Tage-alten gnotobiotischen Mäusen im Vergleich zu konventionell gehaltenen Mäusen gibt. Auch eine einmonatige Behandlung mit einer Kombination verschiedener Antibiotika von RAG^{-/-}-Mäusen verhindert nicht, dass es zu einer spontanen Proliferation von transferierten Zellen kommt [126]. Aufgrund dieser sich widersprechenden Ergebnisse kann die Bedeutung der enterobakteriellen Antigene in der Induktion der Proliferation nicht abschließend beurteilt werden. Es scheint aber unwahrscheinlich, dass kommensale Mikroorganismen der einzige Ursprung von Antigenen sind, die die spontane Proliferation steuern.

In weiteren Versuchen konnten wieder Min *et al.* zeigen, dass T-Zellen einer einzigen Spezifität, wie sie ja beispielsweise in OT-1xRag2^{-/-}-Mäusen gefunden werden, weder in ruhendem, noch aktiviertem Zustand oder im Memory-Status in der Lage sind, eine proliferative Antwort von transferierten polyklonalen Zellen zu unterdrücken. Erst nach vorangegangenem Transfer von polyklonalen CD4-T-Zellen sind diese in der Lage, erneut transferierte CD4-T-Zellen an eine Proliferation suffizient zu hindern [127]. Es scheint also Mechanismen zu geben, die ermöglichen, dass naive Zellen proliferieren und sich auch in Memory-Zellen differenzieren, wenn sie eine „Lücke im Repertoire“ des T-Zell-Pools sehen.

Mit anderen Worten: Offensichtlich beenden Memory-Zellen die Proliferation von naiven Zellen, die Rezeptoren der gleichen Spezifität exprimieren.

Insofern ist es auch nicht verwunderlich, dass es in dem Wildtyp, der über ein breit gefächertes Repertoire an verschiedenen antigenspezifischen T-Zellen verfügt, nicht zu einer spontanen Proliferation kommt.

4.4. FTY720-Einfluss in CCR7^{-/-}-Mäusen

Der CCR7-Rezeptor ist wesentlich am Homingprozess der Lymphozyten beteiligt. Somit stellt er einen möglichen Angriffspunkt dar, um periphere gewebespezifische Toleranz nach Organtransplantation zu induzieren. In Versuchen mit CCR7^{-/-}-Mäusen konnten Beckmann *et al.* zeigen, dass in der Tat bei diesen Tieren ein verlängertes Transplantatüberleben im Vergleich zum Wildtyp möglich ist, jedoch konnte keine Toleranz induziert werden. In weiteren Versuchen führte eine zusätzliche Costimulationsblockade mittels des Anti-CD40-Liganden MR-1 und einer donorspezifischen Transfusion zu einem weiteren verlängerten Transplantatüberleben. Aber auch hier konnte keine Toleranz erzeugt werden (unveröffentlichte Ergebnisse AG Hoffmann, MH Hannover).

Aufgrund des erfolgreichen Einsatzes von FTY720 bei den Untersuchungen von Yan *et al.* und auch bei den eigenen Experimenten, wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass auch in diesem Modell eine Verbesserung des Transplantatüberlebens durch den zusätzlichen Einsatz des Immunmodulators möglich ist. In den eigenen Versuchen konnte diese Hypothese jedoch nicht bestätigt werden, FTY720 hatte in diesem Modell keinen Einfluss auf ein verlängertes Transplantatüberleben.

Dass in CCR7^{-/-}-Empfängertieren im Gegensatz zu dem Wildtyp das Transplantatüberleben beispielsweise nach Herztransplantation zwar verlängert werden kann, aber keine Toleranz induzierbar ist, liegt möglicherweise darin begründet, dass für den Homingprozess der Chemokinrezeptor CCR7 nicht absolut notwendig zu sein scheint. Vielmehr existieren offensichtlich auch CCR7-unabhängige Wege, damit sowohl T-Zellen als auch antigenpräsentierende Zellen in die sekundären lymphatischen Organe gelangen können. Entsprechend haben vermutlich CCR7^{-/-}-Mäuse einen CCR7 unabhängigen Weg der Antigenpräsentation und der T-Zell-Aktivierung entwickelt, um Pathogene oder auch transplantiertes Gewebe erfolgreich zu erkennen und in der Folge abzustößen zu können. Diese Sichtweise wird auch dadurch gestützt, dass in Lymphknoten und Milz von CCR7^{-/-}-Mäusen eine große Population von T-Zellen gefunden werden kann, die den Aktivierungsmarker und Memorymarker CD44 in hoher Konzentration exprimieren [128]. Darüber hinaus scheint es auch wahrscheinlich, dass kreuzreagierende Memory-T-Zellen an der Abstoßungsreaktion von Transplantaten in CCR7^{-/-}-Mäusen beteiligt sind.

Weiterhin wird in der Literatur diskutiert, ob das Priming der alloreaktiven Antwort des Immunsystems nur ausschließlich in den sekundären lymphatischen Geweben geschieht, oder ob dies gar zu einem gewissen Anteil auch im Transplantat selbst passiert. Diese These scheinen auch die Untersuchungen von Beckmann zu unterstützen. Möglicherweise entgehen also Lymphozyten, die fern ab der sekundäre lymphatischen Organe aktiviert werden, dem Effekt von FTY720.

Bisher wurde der Einfluss von FTY720 im Wesentlichen in der Sequestration der Lymphozyten gesehen und als Grund für die entsprechenden Effekte verantwortlich gemacht. Es liegen aber auch Untersuchungen vor, die beschreiben, dass FTY720 auch die Migration in periphere Lymphknoten fördert. Dabei gibt es ebenfalls CCR7 abhängige aber auch CCR7 unabhängige Mechanismen. Henning *et al.* konnten zeigen, dass sowohl in CCR7^{-/-}- als auch in sogenannten *plt*-Mäusen nach FTY720-Behandlung eine signifikante Abnahme aller Lymphozyten im Blut resultiert. Bei den *plt*-Mäusen handelt es sich um knock-out Tiere, die nicht die Chemokine CCL19 und CCL21 produzieren, also nicht in der Lage sind, die Liganden für CCR7 zu bilden. Im Vergleich zum Wildtyp erfolgt die Reduktion der Lymphozyten aus dem Blut langsamer und in einer etwas weniger stark ausgeprägten Weise. Gleichzeitig konnte eine Zunahme der Lymphozyten in den peripheren Lymphknoten als Zeichen der gesteigerten Migration in Lymphknoten registriert werden [84]. Wesentlich verantwortlich für den CCR7-unabhängigen Homingmechanismus scheint das Ligandenpaar CCR2-CCL2 zu sein. Yopp *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von CCR7 aber auch von CCR2 über den S1P-Rezeptor durch FTY720 in ähnlicher Weise stimuliert werden kann, wobei aber offensichtlich unterschiedliche molekulare Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Andere Chemokinrezeptoren spielen vermutlich aber keine wesentliche Rolle unter der Therapie mit FTY720, da deren Expression unangetastet durch S1P-Rezeptoren bleibt [129, 130]. Insofern wird möglicherweise in diesem Modell gerade durch FTY720 der Effekt aufgehoben, der an sich durch die Ausschaltung des Chemokinrezeptors CCR7 erreicht werden sollte. Letztendlich scheint es aber für die Toleranzinduktion unabhängig zu sein, ob der Homingprozess über CCR7 gesteuert wird oder nicht.

5. Zusammenfassung

Um Herztransplantate suffizient und reproduzierbar in lymphopenen Empfängertieren, wie RAG2^{-/-}-Mäuse, abstoßen zu können, müssen $1 \cdot 10^7$ T-Zellen transferiert werden. Ein vergleichbarer Zeitraum, wie er im Wildtyp zu beobachten ist, ist jedoch nicht zu erreichen.

Die homeostatische Proliferation, wie sie in lymphopenen Individuen stattfindet, nachdem diese mit T-Zellen rekonstituiert wurden, stellt ein Hindernis dar, um in derartigen Empfängertieren eine Toleranz nach Herztransplantation zu induzieren. Unter einer Kombinationstherapie aus Costimulationsblockade mittels des CD40L-Antikörpers MR-1 und einer donorspezifischen Transfusion von Milzzellen einerseits und der Applikation des Immunmodulators FTY720 andererseits kann das Transplantatüberleben nach Herztransplantation signifikant gesteigert werden. Eine komplette Toleranzinduktion konnte jedoch nicht erreicht werden.

Ein hemmender Einfluss von FTY720 auf die homeostatische Proliferation ließ sich nicht nachweisen. Die Art und Weise des synergistischen Effektes von FTY720 und Costimulationsblockade plus donorspezifischer Transfusion bleibt zunächst offen.

Werden OT-1xRAG2^{-/-}-Mäuse, die zwar funktionell, nicht aber anatomisch als lymphopen zu betrachten sind, Lymphozyten transferiert, so ist hier mittels einer Costimulationsblockade plus donorspezifischer Transfusion die Induktion peripherer Toleranz nach Herztransplantation wieder möglich. In diesem Modell kann die homeostatische Proliferation, suffizient unterdrückt werden.

Nicht vermeiden lässt sich eine schnelle bzw. spontane Proliferation der Lymphozyten. Ursache dieser Proliferation scheint ein Bestreben nach einem komplexen T-Zell-Rezeptorpool zu sein. Ein hemmender Einfluss dieser Proliferation auf die Induktion peripherer Toleranz scheint nicht zu bestehen.

Ein positiver Effekt von FTY720 in Bezug auf eine Verlängerung des Transplantatüberlebens, wie er in dem Modell mit RAG2^{-/-}-Tieren gefunden wurde, konnte bei CCR7^{-/-}-Mäusen nicht beobachtet werden. Möglicherweise hat FTY720 und das Fehlen von CCR7 konträre Wirkungen, die sich egalalisieren.

6. Literatur

1. Perico, N. and G. Remuzzi, *Prevention of transplant rejection: current treatment guidelines and future developments*. *Drugs*, 1997. **54**(4): p. 533-70.
2. Kontoyiannis, D.P. and R.H. Rubin, *Infection in the organ transplant recipient. An overview*. *Infect Dis Clin North Am*, 1995. **9**(4): p. 811-22.
3. Leblond, V., et al., *Lymphoproliferative disorders after organ transplantation: a report of 24 cases observed in a single center*. *J Clin Oncol*, 1995. **13**(4): p. 961-8.
4. Helderman, J.H. and S. Goral, *Transplantation for the millennium: attaining tolerance in our time--the Holy Grail*. *Semin Nephrol*, 2000. **20**(1): p. 83-6.
5. von Andrian, U.H. and T.R. Mempel, *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(11): p. 867-78.
6. Fu, Y.X. and D.D. Chaplin, *Development and maturation of secondary lymphoid tissues*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 399-433.
7. Forster, R., et al., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen*. *Cell*, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
8. Cyster, J.G., *Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 127-59.
9. Yopp, A.C., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptors regulate chemokine-driven transendothelial migration of lymph node but not splenic T cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(5): p. 2913-24.
10. Lo, C.G., T.T. Lu, and J.G. Cyster, *Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp*. *J Exp Med*, 2003. **197**(3): p. 353-61.
11. Cyster, J.G., *Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs*. *Science*, 1999. **286**(5447): p. 2098-102.
12. Ganpule, G., et al., *Low affinity of cell surface lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) generates selectivity for cell-cell interactions*. *J Immunol*, 1997. **159**(6): p. 2685-92.
13. Grakoui, A., et al., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. *Science*, 1999. **285**(5425): p. 221-7.
14. Gunzer, M., et al., *Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential*. *Immunity*, 2000. **13**(3): p. 323-32.

15. Schlienger, K., et al., *Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3490-8.
16. They, C. and S. Amigorena, *The cell biology of antigen presentation in dendritic cells*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 45-51.
17. Schwartz, R.H., *A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy*. Science, 1990. **248**(4961): p. 1349-56.
18. Gonzalo, J.A., et al., *Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 1-5.
19. Walunas, T.L., et al., *CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation*. Immunity, 1994. **1**(5): p. 405-13.
20. Wang, S., et al., *Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2808-13.
21. Mackey, M.F., R.J. Barth, Jr., and R.J. Noelle, *The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(4): p. 418-28.
22. Andreasen, S.O., et al., *Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3689-97.
23. Vinay, D.S. and B.S. Kwon, *Role of 4-1BB in immune responses*. Semin Immunol, 1998. **10**(6): p. 481-9.
24. Futagawa, T., et al., *Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells*. Int Immunol, 2002. **14**(3): p. 275-86.
25. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on SIP receptor 1*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 355-60.
26. Jameson, S.C., *Maintaining the norm: T-cell homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 547-56.
27. Tan, J.T., et al., *IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8732-7.
28. Goldrath, A.W., et al., *Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1515-22.
29. Takeda, S., et al., *MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span*. Immunity, 1996. **5**(3): p. 217-28.

30. Tanchot, C., et al., *Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2057-62.
31. Tough, D.F. and J. Sprent, *Turnover of naive- and memory-phenotype T cells*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1127-35.
32. Swain, S.L., H. Hu, and G. Huston, *Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1381-3.
33. Kassiotis, G., et al., *Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 244-50.
34. Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 183-90.
35. Ernst, B., et al., *The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 173-81.
36. Gudmundsdottir, H. and L.A. Turka, *A closer look at homeostatic proliferation of CD4+ T cells: costimulatory requirements and role in memory formation*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3699-707.
37. Kieper, W.C. and S.C. Jameson, *Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13306-11.
38. Murali-Krishna, K. and R. Ahmed, *Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 1733-7.
39. Goldrath, A.W., L.Y. Bogatzki, and M.J. Bevan, *Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation*. J Exp Med, 2000. **192**(4): p. 557-64.
40. Min, B., et al., *Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6039-44.
41. Dummer, W., et al., *Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2460-8.
42. Ninova, D., et al., *A novel model of allograft rejection: immune reconstitution of Rag-1 recipients with 2C transgenic T-cell receptor lymphocytes*. Transpl Int, 2005. **18**(1): p. 101-10.
43. Strasser, A., *Life and death during lymphocyte development and function: evidence for two distinct killing mechanisms*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(2): p. 228-34.

44. Surh, C.D. and J. Sprent, *T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus*. *Nature*, 1994. **372**(6501): p. 100-3.
45. Kabelitz, D., *Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance*. *Transplantation*, 1998. **65**(7): p. 869-75.
46. Chavin, K.D., et al., *Combination anti-CD2 and anti-CD3 monoclonal antibodies induce tolerance while altering interleukin-2, interleukin-4, tumor necrosis factor, and transforming growth factor-beta production*. *Ann Surg*, 1993. **218**(4): p. 492-501; discussion 501-3.
47. Sayegh, M.H., et al., *Donor antigen is necessary for the prevention of chronic rejection in CTLA4Ig-treated murine cardiac allograft recipients*. *Transplantation*, 1997. **64**(12): p. 1646-50.
48. Iwakoshi, N.N., et al., *Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner*. *J Immunol*, 2000. **164**(1): p. 512-21.
49. Elster, E.A., et al., *Primate skin allotransplantation with anti-CD154 monotherapy*. *Transplant Proc*, 2001. **33**(1-2): p. 675-6.
50. Lehnert, A.M., et al., *Blockade of the CD28 and CD40 pathways result in the acceptance of pig and rat islet xenografts but not rat cardiac grafts in mice*. *Transpl Immunol*, 2001. **9**(1): p. 51-6.
51. Xu, H., et al., *Effects of dose and duration of anti-CD154 antibody therapy in preventing renal allograft rejection in a nonhuman primate model*. *Transplant Proc*, 2001. **33**(1-2): p. 223-4.
52. Yin, D., et al., *Intact active bone transplantation synergizes with anti-CD40 ligand therapy to induce B cell tolerance*. *J Immunol*, 2002. **168**(10): p. 5352-8.
53. Tung, T.H., S.E. Mackinnon, and T. Mohanakumar, *Long-term limb allograft survival using anti-CD40L antibody in a murine model*. *Transplantation*, 2003. **75**(5): p. 644-50.
54. Shimizu, K., et al., *Host CD40 ligand deficiency induces long-term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis*. *J Immunol*, 2000. **165**(6): p. 3506-18.
55. Guo, Z., et al., *Cutting edge: membrane lymphotoxin regulates CD8(+) T cell-mediated intestinal allograft rejection*. *J Immunol*, 2001. **167**(9): p. 4796-800.

56. Yan, S., et al., *Protection of mouse small bowel allografts by FTY720 and costimulation blockade*. Transplantation, 2005. **79**(12): p. 1703-10.
57. Wu, Z., et al., *Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 87-92.
58. Valujskikh, A., B. Pantenburg, and P.S. Heeger, *Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice*. Am J Transplant, 2002. **2**(6): p. 501-9.
59. Zhai, Y., et al., *Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4667-73.
60. McLeod, H.L., D.R. Miller, and W.E. Evans, *Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient*. Lancet, 1993. **341**(8853): p. 1151.
61. Morris, P.J. and N.K. Russell, *Alemtuzumab (Campath-1H): a systematic review in organ transplantation*. Transplantation, 2006. **81**(10): p. 1361-7.
62. Michallet, M.C., et al., *Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins*. Transplantation, 2003. **75**(5): p. 657-62.
63. Beckmann, J.H., et al., *Prolongation of allograft survival in ccr7-deficient mice*. Transplantation, 2004. **77**(12): p. 1809-14.
64. Spiegel, S. and S. Milstien, *Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(5): p. 397-407.
65. Ishii, I., et al., *Lysophospholipid receptors: signaling and biology*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 321-54.
66. Cinamon, G., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 713-20.
67. Graeler, M. and E.J. Goetzl, *Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells*. Faseb J, 2002. **16**(14): p. 1874-8.
68. Kveberg, L., et al., *Sphingosine 1 phosphate induces the chemotaxis of human natural killer cells. Role for heterotrimeric G proteins and phosphoinositide 3 kinases*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 1856-64.
69. Brinkmann, V., et al., *The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21453-7.

70. Mandala, S., et al., *Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists*. Science, 2002. **296**(5566): p. 346-9.
71. Sanchez, T. and T. Hla, *Structural and functional characteristics of SIP receptors*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 913-22.
72. Siehler, S. and D.R. Manning, *Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 94-9.
73. Okamoto, H., et al., *Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(24): p. 9247-61.
74. Arikawa, K., et al., *Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous SIP2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32841-51.
75. Paik, J.H., et al., *Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 11830-7.
76. Sugimoto, N., et al., *Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(5): p. 1534-45.
77. Czeloth, N., et al., *Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2960-7.
78. Kiuchi, M., et al., *Synthesis and immunosuppressive activity of 2-substituted 2-aminopropane-1,3-diols and 2-aminoethanols*. J Med Chem, 2000. **43**(15): p. 2946-61.
79. Kiuchi, M., et al., *Synthesis and biological evaluation of 2,2-disubstituted 2-aminoethanols: analogues of FTY720*. Bioorg Med Chem Lett, 1998. **8**(1): p. 101-6.
80. Yanagawa, Y., Y. Masubuchi, and K. Chiba, *FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats, III. Increase in frequency of CD62L-positive T cells in Peyer's patches by FTY720-induced lymphocyte homing*. Immunology, 1998. **95**(4): p. 591-4.

81. Pinschewer, D.D., et al., *FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5761-70.
82. Brinkmann, V., et al., *FTY720: a novel transplantation drug that modulates lymphocyte traffic rather than activation*. Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(2): p. 49-52.
83. Graler, M.H. and E.J. Goetzl, *The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors*. Faseb J, 2004. **18**(3): p. 551-3.
84. Henning, G., et al., *CC chemokine receptor 7-dependent and -independent pathways for lymphocyte homing: modulation by FTY720*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1875-81.
85. Lan, Y.Y., et al., *The sphingosine-1-phosphate receptor agonist FTY720 modulates dendritic cell trafficking in vivo*. Am J Transplant, 2005. **5**(11): p. 2649-59.
86. Zhang, L., et al., *Pretreatment with FTY720 alone induced long-term survival of mouse heart allograft*. Transplant Proc, 2003. **35**(1): p. 567-8.
87. Kahan, B.D., *FTY720: a new immunosuppressive agent with novel mechanism(s) of action*. Transplant Proc, 1998. **30**(5): p. 2210-3.
88. Furukawa, H., et al., *Prolongation of canine liver allograft survival by a novel immunosuppressant, FTY720: effect of monotherapy and combined treatment with conventional drugs*. Transplantation, 2000. **69**(2): p. 235-41.
89. Suzuki, S., et al., *An immunosuppressive regimen using FTY720 combined with cyclosporin in canine kidney transplantation*. Transpl Int, 1998. **11**(2): p. 95-101.
90. Schuurman, H.J., et al., *Oral efficacy of the new immunomodulator FTY720 in cynomolgus monkey kidney allotransplantation, given alone or in combination with cyclosporine or RAD*. Transplantation, 2002. **74**(7): p. 951-60.
91. Kimura, T., et al., *FTY720 reduces T-cell recruitment into murine intestinal allograft and prevents activation of graft-infiltrating cells*. Transplantation, 2003. **75**(9): p. 1469-74.
92. Fu, F., et al., *Long-term islet graft survival in streptozotocin- and autoimmune-induced diabetes models by immunosuppressive and potential insulinotropic agent FTY720*. Transplantation, 2002. **73**(9): p. 1425-30.
93. Dragun, D., et al., *FTY720: early clinical experience*. Transplant Proc, 2004. **36**(2 Suppl): p. 544S-548S.
94. Biotech, D., *Dynabeads Sheep anti-Rat IgG*. 2005.

95. Lyons, A.B. and C.R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **171**(1): p. 131-7.
96. Corry, R.J., H.J. Winn, and P.S. Russell, *Heart transplantation in congenic strains of mice*. Transplant Proc, 1973. **5**(1): p. 733-5.
97. Chalasani, G., et al., *Recall and propagation of allospecific memory T cells independent of secondary lymphoid organs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6175-80.
98. Neujahr, D.C., et al., *Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4632-9.
99. Itoh, M., et al., *Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5317-26.
100. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.
101. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
102. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
103. Apostolou, I., et al., *Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen*. Nat Immunol, 2002. **3**(8): p. 756-63.
104. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas, *Natural versus adaptive regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 253-7.
105. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. Cell, 2000. **101**(5): p. 455-8.
106. Nishimura, E., et al., *Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells*. Int Immunol, 2004. **16**(8): p. 1189-201.
107. Ochando, J.C., et al., *Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6993-7005.
108. Habicht, A., et al., *Novel insights into the mechanism of action of FTY720 in a transgenic model of allograft rejection: implications for therapy of chronic rejection*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 36-42.

109. Xie, J.H., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor agonism impairs the efficiency of the local immune response by altering trafficking of naive and antigen-activated CD4+ T cells*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3662-70.
110. Weninger, W., et al., *Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells*. J Exp Med, 2001. **194**(7): p. 953-66.
111. Zhang, Q., et al., *Lymphoid sequestration of alloreactive memory CD4 T cells promotes cardiac allograft survival*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 770-7.
112. Wells, A.D., et al., *Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1303-7.
113. Fujino, M., et al., *T-cell apoptosis triggered by FTY720 via mitochondrial pathway*. Transplant Proc, 2001. **33**(7-8): p. 3084-5.
114. Li, X.K., et al., *Induction of lymphocyte apoptosis by a novel immunosuppressant FTY720: relation with Fas, Bcl-2 and Bax expression*. Transplant Proc, 1997. **29**(1-2): p. 1267-8.
115. Nagahara, Y., et al., *Evidence that FTY720 induces T cell apoptosis in vivo*. Immunopharmacology, 2000. **48**(1): p. 75-85.
116. Suzuki, S., et al., *Induction of lymphocyte apoptosis and prolongation of allograft survival by FTY720*. Transplant Proc, 1996. **28**(4): p. 2049-50.
117. Bohler, T., et al., *FTY720 mediates apoptosis-independent lymphopenia in human renal allograft recipients: different effects on CD62L+ and CCR5+ T lymphocytes*. Transplantation, 2004. **77**(9): p. 1424-32.
118. Shroff, K.E. and J.J. Cebra, *Development of mucosal humoral immune responses in germ-free (GF) mice*. Adv Exp Med Biol, 1995. **371A**: p. 441-6.
119. Umesaki, Y., et al., *Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus*. Immunology, 1993. **79**(1): p. 32-7.
120. Wannemuehler, M.J., et al., *Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction*. J Immunol, 1982. **129**(3): p. 959-65.
121. Maeda, Y., et al., *The failure of oral tolerance induction is functionally coupled to the absence of T cells in Peyer's patches under germfree conditions*. Immunobiology, 2001. **204**(4): p. 442-57.
122. Walton, K.L., et al., *T cell-mediated oral tolerance is intact in germ-free mice*. Clin Exp Immunol, 2006. **143**(3): p. 503-12.

123. Strauch, U.G., et al., *Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis*. Gut, 2005. **54**(11): p. 1546-52.
124. Gad, M., et al., *Demonstration of strong enterobacterial reactivity of CD4+CD25- T cells from conventional and germ-free mice which is counter-regulated by CD4+CD25+ T cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 695-704.
125. Ostman, S., et al., *Impaired regulatory T cell function in germ-free mice*. Eur J Immunol, 2006. **36**(9): p. 2336-46.
126. Min, B., et al., *Gut flora antigens are not important in the maintenance of regulatory T cell heterogeneity and homeostasis*. Eur J Immunol, 2007. **37**(7): p. 1916-23.
127. Min, B., et al., *Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(11): p. 3874-9.
128. Forster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
129. Honig, S.M., et al., *FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes*. J Clin Invest, 2003. **111**(5): p. 627-37.
130. Yopp, A.C., et al., *FTY720-enhanced T cell homing is dependent on CCR2, CCR5, CCR7, and CXCR4: evidence for distinct chemokine compartments*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 855-65.

7. Anhang

7.1. Tabelle der Verbrauchsmaterialien, Pharmaka und Geräte

Verbrauchsmaterialien	
4-0 Dexon	Braun (Melsung)
7-0 Ligatur	Resorba (Nürnberg)
Braunolind	Hartmann (Heidenheim)
Deckgläser	Jürgens (Hannover)
Einmal-Injektionskanülen	Braun (Melsung)
Leukopor	Beiersdorf (Hamburg)
Objektträger	Jürgens (Hannover)
Pasteurpipetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Röhrchen 10ml, 50ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Altromin 1324 Alleinfutter	Altromin GmbH (Lage)
Petrischalen	Nunc (Wiesbaden)
70 µm Nylon-Netz	NeoLab (Heidelberg)
Nylon-Netz-Halterungsringe	Forschungswerkstätten MHH (Hannover)
FACS-Röhrchen (BD Falcon)	BD Biosciences (USA)
Reaktionsgefäß, 2ml	Eppendorf (Hamburg)
Spritzen, 1ml, 2ml, 5ml, 10ml	Braun (Melsung)
Transpor	3M (USA)
Tupfer	Noba Verbandmittel Danz (Wetter)
Watte	Rauscher (Wien)
Infusionslösungen und Pharmaka	
FTY720	Novartis Pharma (Schweiz)
Heparin-Natrium	Hoffmann-La Roche (Grenzbach-Wyhlen)
Ketamin 10%	WDT (Garbsen)
Natriumchlorid 0,9%	Braun (Melsung)
Novalgin	Ratiopharm (Ulm)
Ringer-Lactat DAB 7	Braun (Melsung)
Rompun®	BayerVital (Leverkusen)

Geräte	
Operationsmikroskop Stemi SV 6	Zeiss (Jena)
Mischgerät	Jürgens (Hannover)
i.v.-Injektionshilfe	Forschungswerkstätten MHH (Hannover)
Lichtmikroskop	Olympus (Hamburg)
Sterilwerkbank, Lamin-Air	Heraeus (Hanau)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Durchflusszytometer FACStar	Becton Dickonson (Heidelberg)
Durchflusszytometer FACalibur	Becton Dickonson (Heidelberg)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Zentrifuge (Varifuge)	Heraeus Instruments (Hanau)
Zentrifuge (Varifuge 3.2RS)	Heraeus Instruments (Hanau)
Instrumente	
Applikator inklusive Mikrogefäßklemme	Clay Adams/Becton Dickinson (Heidelberg)
Nadelhalter, BM 215	Aesculap (Tuttlingen)
Nadelhalter, mikrochirurgisch, gebogen FD 241	Aesculap (Tuttlingen)
Pinzette, BD315	Aesculap (Tuttlingen)
Pinzette, mikrochirurgisch, BD 331	Aesculap (Tuttlingen)
Schere, BC131	Aesculap (Tuttlingen)
Federschere, mikrochirurgisch, FD013	Aesculap (Tuttlingen)
Spreizer, BV070	Aesculap (Tuttlingen)
Chemikalien	
BSA	Serva (Heidelberg)
CFSE	AG R. Förtser, MH Hannover (Hannover)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom KG Seromed (Berlin)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumazid	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)

Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
PBS	Biochrom KG Seromed (Berlin)
Streptavidin Peroxidase	Dianova (Hamburg)
Trypanblau	Fluka AG, Buchs (Schweiz)

7.2. Ansätze gebräuchlicher Lösungen

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS), Biochrom KG (Berlin)

0,2 g/l Kaliumchlorid
0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat
0,049 g/l Magnesiumchlorid
8 g/l Natriumchlorid
1,5 g/l Natriumhydrogenphosphat
in H₂O (pH 7,4)

FACS-Waschmedium

0,5% BSA
0,1% Natriumazid
in PBS

Erylysepuffer

156 mM Ammoniumchlorid
0,1 mM EDTA
12 mM Natriumhydrogencarbonat
in H₂O (pH 7,3)

Normales Mausserum, Herstellung AG Prof. Hoffmann

7.3. Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
APC	antigen presenting cell
BSA	bovine serum albumin
CCL	Chemokin
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
CFSE	5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
DC	Dendritische Zelle
DST	Donor spezifische Transfusion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescens activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
GALT	Gut associated lymphatic tissue
GaR	Goat anti rat
HEV	hochendotheliale Venen
HP	homeostatische Proliferation
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IE	internationale Einheiten
IEL	Intraintestinale Lymphozyten
Ig	Immunglobulon
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LFA	Leucocyte function-associated antigen
LIP	Lymphopenie induzierte Proliferation
MHC	major histocompatibility complex
n	Anzahl
OT	Ovalbumin transgen
PALS	periarteriolar lymphoid sheath

PBS	Phosphat buffer solution
PNDA	peripheral node addressin
PP	Peyersche Platten
RAG	Recombination activation gene
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SCID	Severe combined immunodeficiency / Schwerer kombinierter Immundefekt
TCR	T-Zell-Rezeptor
Treg	regulatorische T-Zelle
VCAM	vascular cell adhesion molecule
WT	Wildtyp

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Matthias Hoffmann für die Bereitstellung der interessanten Thematik, das in mich gesetzte Vertrauen und die sehr hilfreiche Unterstützung durch konstruktive Kritik und vielfältige Anregungen.

Dr. Jan Beckmann danke ich ebenfalls für die freundschaftliche Begleitung und die Einarbeitung in das wissenschaftliche Arbeiten.

Prof. Dr. Klemptner, Direktor der Abteilung Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, und Prof. Dr. Wonigeit, Leiter des Transplantationsimmunologischen Labors, danke ich für die Möglichkeit in ihrer Abteilung arbeiten zu dürfen und die Bereitstellung des gut ausgerüsteten Arbeitsplatzes.

Dorothee Römermann und Susanne Skubich danke ich für die sehr gute Betreuung und Einarbeitung in die verschiedenen Techniken des Laboralltags und für die aufwendige und komplexe Zucht der verschiedenen transgenen Mausstämme.

Dr. Jiong Tian und Xiaosun Liu danke ich für die hervorragende und zuverlässige Durchführung der aufwendigen Herztransplantationen.

Die Forschungsarbeit wurde in Kooperation mit der Abteilung für Immunologie unter der Leitung von Prof. Dr. Förster durchgeführt. PD Dr. Pabst danke ich für freundliche Bereitstellung von CFSE und FTY720, sowie einiger Ly5.1-Mäuse.

Mit großem Engagement waren auch die Pflegekräfte des Zentralen Tierlabors der MHH beteiligt. Hervorheben möchte ich die nette und kompetente Hilfe durch Christa Ziegowski.

Nicht zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Frau Anja, meinen Eltern Maria und Norbert Wemhoff, meinen Geschwistern und meinen Freunden bedanken, die mich den gesamten Zeitraum über unterstützt haben.

9. Lebenslauf

Daniel Wemhoff, geb. 4. August 1978 in Georgsmarienhütte

Schulbildung

- 1985 - 1989 Grundschule Michaelisschule Oesede / Georgsmarienhütte
1989 - 1991 Orientierungsstufe Overbergschule Oesede / Georgsmarienhütte
1991 - 1998 Gymnasium Oesede / Georgsmarienhütte
1998 Abitur

Ausbildung

- 1998 - 2001 Krankenpflegeausbildung Marienhospital Osnabrück
2001 Examen als Krankenpfleger

Studium

- 2001 - 2007 Medizinstudium an der Medizinischen Hochschule Hannover
2003 Erste Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (ehemals Ärztliche Vorprüfung)
2006 - 2007 Praktisches Jahr
Anästhesiologie, Medizinische Hochschule Hannover
Chirurgie, St. Marienhospital Vechta
Innere Medizin, Marienhospital Osnabrück
2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf

- seit 12/2007 Assistenzarzt im Marienhospital Osnabrück, Abteilung für Anästhesiologie,
Intensivmedizin und Schmerztherapie,
Leitung PD Dr. med. Martin Beiderlinden

10. Veröffentlichungen

10.1. Wissenschaftliche Vorträge

Workshop „Transplantationsimmunologie“ –

Arbeitskreis Transplantationsimmunologie der deutschen Gesellschaft für
Immunologie (Dgfi)

Regensburg, 7./8. April 2006

„FTY720 can partially overcome homeostatic proliferation and tolerance resistance in
lymphopenic hosts“

Wemhoff D, Tian J, Römermann D, Skubich S, Klempnauer J, Hoffmann MW

10.2. Poster

World Transplant Congress 2006

Boston, 22.-27. Juli 2006

“FTY720 can partially overcome homeostatic proliferation and tolerance resistance in
lymphopenic hosts“

Wemhoff D, Tian J, Römermann D, Skubich S, Klempnauer J, Hoffmann MW

11. Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 PromO

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Induktion von Transplantatlangzeitüberleben in lymphopenen T-Zell-rekonstituierten Empfängern im heterotopen Herztransplantationsmodell in der Maus“

im Transplantationslabor der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule unter der Betreuung von

Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Matthias W. Hoffmann

mit der Unterstützung von

Dr. Jiong Tian und Xiaosun Liu

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hannover, im Oktober 2008

Daniel Wemhoff