

Die Deletion des zytotoxischen NK-Zellrezeptors NKp46 führt zu einer Modulation der Immunantwort bei der Abstoßung muriner Herztransplantate

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin
Cam-Tien Le

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.rer.nat. -

Genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl

Berichter: Prof. Dr. Roland Lauster

Berichter: Prof. Dr. Katja Kotsch

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 04.02.2011

Berlin 2011

D83

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	GRUNDLAGEN DER TRANSPLANTATIONSIMMUNOLOGIE	2
1.1.1	Begriffsdefinition der Transplantation	2
1.1.2	Mechanismen der Transplantatabstoßung	2
1.1.2.1	T-Zell-vermittelte Immunantwort bei der Transplantatabstoßung	4
1.2	EINFLUSS DER IMMUNSUPPRESSION	6
1.2.1	Induktion einer Transplantat-Toleranz durch Immunsuppressiva	7
1.3	DIE NATÜRLICHE IMMUNANTWORT IN DER TRANSPLANTAT-ABSTOßUNG	9
1.3.1	Natürliche Killerzellen	9
1.3.1.1	NK-Zellrezeptoren	10
1.3.1.1.1	MHC-I-spezifische Ly49 Rezeptoren	10
1.3.1.2	Die Regulation der NK-Zelle	13
1.3.1.3	Der nicht-MHC-reaktive aktivierende Rezeptor „NKp46“ (NCR1)	14
1.4	DIE ROLLE VON NK-ZELLEN IN DER TRANSPLANTATABSTOßUNG	16
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	MATERIAL	20
2.1.1	Medien und Puffer	20
2.1.2	Kits	20
2.1.3	Geräte	21
2.1.4	Software	21
2.2	VERSUCHSTIERE	21
2.2.1	Tierspezies und Tierhaltung	21
2.2.2	Genehmigung der Tierversuche	22
2.3	TIERMODELL	22
2.3.1	Die NCR1 ^{GFP/GFP} Maus	22
2.3.2	MHC-mismatch bei gewählter Stammkombination	23
2.4	ABDOMINAL HETEROTOPE HERZTRANSPLANTATION	23
2.4.1	Anästhesie	24
2.4.2	Operationsinstrumentarium	25
2.4.3	Mikrochirurgisches Vorgehen	26
2.4.3.1	Spenderoperation und Entnahme des Transplantates	26
2.4.3.2	Transplantation im Empfängertier	26
2.4.4	Transplantatfunktion	28
2.4.5	Transplantatentnahme	28
2.5	MOLEKULARBIOLOGIE	28
2.5.1	Arbeiten mit RNA	28
2.5.1.1	RNA-Isolation	28
2.5.1.2	RNA-Quantifizierung	29
2.5.2	Reverse Transkription	29
2.5.3	Präamplifikation	30

2.5.4	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	31
2.5.4.1	TaqMan-Assay	31
2.5.4.2	Relative Quantifizierung	32
2.5.4.3	Generierung eines TaqMan-Panels	33
2.6	IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	35
2.6.1	Gefrierschnitte	35
2.6.2	Fluoreszenzfärbung	35
2.6.3	Fluoreszenzmikroskopie	36
2.7	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	36
2.7.1	Probenaufbereitung	36
2.7.1.1	Plasmagewinnung	36
2.7.1.2	Lymphozytenisolierung aus der Milz	36
2.7.1.3	Gewinnung von Lymphozyten aus dem Lymphknoten	37
2.7.1.4	Isolation von Transplantat-infiltrierenden Lymphozyten	37
2.7.2	Magnetische Sortierung von Zellen (MACS)	37
2.7.3	Zytotoxizitätstest mit PKH26 und 7AAD	38
2.8	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	39
2.9	ZYTOKINBESTIMMUNG	40
2.9.1	Cytometric Bead Array (CBA)	40
2.9.2	ELISA (enzyme linked immunoabsorbent-assay)	40
2.10	STATISTIK	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	NATÜRLICHE KILLERZELLEN UND DENDRITISCHE ZELLEN INFILTRIEREN VOR T-ZELLEN IN DAS ALLOTRANSPLANTAT	42
3.1.1	Die NK-Zell-Komposition wird während des Abstoßungsprozesses auch in den peripheren lymphatischen Organen moduliert	45
3.1.1.1	Kinetische Regulation der Infiltration von Lymphozyten aus der Milz	45
3.1.1.2	Kinetik der Mobilisierung von Lymphozyten aus Lymphknoten	46
3.2	DIE VERTEILUNG DER VERSCHIEDENEN LYMPHOZYTENPOPULATIONEN BLEIBT DURCH DIE NCR1-DELETION UNVERÄNDERT	48
3.2.1	NCR1-defiziente Mäuse exprimieren Ly49 NK-Zellrezeptoren	49
3.3	NCR1-DEFIZIENTE MÄUSE STOßEN ALLOGENE HERZTRANSPLANTATE VERZÖGERT AB	50
3.3.1	Transplantatüberleben mit Kostimulationsblockade	51
3.4	NK-ZELLEN AUS TRANSPLANTIERTEN TIEREN SIND ZYTOTOXISCHER ALS NAIVE NK-ZELLEN	52
3.5	ALLOGENE HERZTRANSPLANTATE ZEIGEN EIN LEUKOZYTÄRES INFILTRAT	53
3.5.1	Während des Abstoßungsprozesses wandern die NK-Zellen der Milz in T-Zellzonen ein	54
3.6	ZUM ZEITPUNKT DER ABSTOSSUNG ZEIGEN NCR1-DEFIZIENTE ALLOTRANSPLANTATE EIN UNTERSCHIEDLICHES INFILTRATIONSPROFIL ALS WILDTYP-EMPFÄNGER	56

3.6.1	Geringere Infiltrationsraten von NK-Zellen nach Transplantation allogener Herzen in NCR1 ^{GFP/GFP} Mäuse	56
3.6.2	Eine NCR1-Defizienz führt zur Reduktion der Transplantat-Infiltration von CD4 ⁺ T-Zellen und zu einer Induktion von CD8 ⁺ T-Zellen	57
3.6.3	Regulatorische T-Zellen sind in NCR1-deletierten Mäusen induziert	59
3.7	VERRINGERTE PRODUKTION INFLAMMATORISCHER ZYTOKINE UND EFFEKTORMOLEKÜLEN IN NCR1^{GFP/GFP} MÄUSEN	60
3.7.1	Reduzierte Perforin und IFN-γ mRNA-Expressionen in den Organen NCR1-defizienter Empfängertiere	61
3.7.2	Im Serum transplantierte NCR1 ^{GFP/GFP} Mäusen werden geringere Konzentrationen an Zytokinen und Effektormolekülen detektiert	62
3.8	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	64
4	DISKUSSION	65
4.1	DIE ROLLE VON NATÜRLICHEN KILLERZELLEN IM MURINEN HERZTRANSPLANTATIONSMODELL	65
4.1.1	Die kinetische Regulation des Trafficking von Lymphozyten in Abstoßungsprozessen	67
4.1.2	NK-Zelltrafficking innerhalb der peripheren lymphatischen Organe	70
4.2	EINE NCR1-DEFIZIENZ MODULIERT DIE IMMUNANTWORT BEI ABSTOßUNGSREAKTIONEN	71
4.2.1	Auswirkungen der NCR1-Defizienz auf NK-Zellen	72
4.2.2	Eine NCR1-Defizienz moduliert die T-Zellantwort zugunsten von CD8 ⁺ Zellen	73
4.2.3	NK-Zellen und regulatorische T-Zellen regulieren sich gegenseitig	76
4.2.4	NCR1-Defizienz unter Kostimulationsblockade	78
4.3	FÜR DIE VERZÖGERTE ABSTOßUNG BEI NCR1-DEFIZIENZ IST DIE MODULATION DER ANGEBORENEN UND ERWORBENEN IMMUNANTWORT VERANTWORTLICH	81
I)	ZUSAMMENFASSUNG	84
II)	LITERATURVERZEICHNIS	85
III)	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	100

1 EINLEITUNG

Die Geschichte der Organtransplantation der letzten Jahrzehnte wurde maßgeblich von der Entwicklung von Anastomosentechniken, dem Verständnis immunologischer Grundlagen und der Entdeckung potenter Immunsuppressiva beeinflusst.

Die ersten Versuche einer Organverpflanzung gehen auf die Anfänge des letzten Jahrhunderts zurück. Nachdem Alexis Carrel eine Technik für Gefäßanastomosen entwickelte und 1912 für seine Arbeiten den Nobelpreis erhielt [Carrel, 1964], folgten Nierentransplantationen an Hunden und Ziegen. 1905 wurde die erste erfolgreiche heterotope Herztransplantation in Hunden durchgeführt, bei welcher das Herz ca. zwei Stunden schlug [Carrel und Guthrie, 1905]. In der Folgezeit wurde die Kaltischämie, d.h. die Kühlung der Transplantate zwischen der Ex- und Implantation, eingeführt [Oudot, 1948]. Im Jahre 1923 beschrieb Carl Williams erstmalig die histologischen Unterschiede zwischen syngen (genetisch identisch) und allogenen (genetisch verschieden) transplantierten Nieren [Williams, 1923] und führte die Unterschiede auf biologische Unverträglichkeiten, hervorgerufen durch Blutbestandteile, zurück. Die erste erfolgreiche solide Organtransplantation am Menschen gelang 1954 von Joseph Murray im Peter Bent Brigham Hospital in Boston, bei der eine langfristig erfolgreiche Übertragung einer Niere von einem Lebendspender auf seinen eineiigen Zwilling Bruder erfolgte [Hume *et al.*, 1955]. In den darauffolgenden Jahren konnten aus den USA erfolgreiche Nieren-, Leber-, Lungen- und Pankreastransplantationen gemeldet werden. Die erste Herztransplantation im Menschen gelang 1967 Christiaan Barnard in Südafrika, nach experimentellen Vorversuchen durch Norman Lower und Richard Shumway aus Stanford.

Der Entwicklung verbesserter chirurgischer Operationstechniken und potenter Immunsuppressiva ist es zu verdanken, dass Organtransplantationen heute erfolgreich in der klinischen Routine etabliert werden konnten. Über 40 Jahre nach der ersten Herztransplantation hat sich die Ein-Jahres-Überlebensrate von 20% im Jahre 1968 bis heute bei Männern auf 88% und bei Frauen auf 77,3% gesteigert [American Heart Association, 2009]. Allerdings müssen die Patienten nebenwirkungsreiche Medikamente ein Leben lang einnehmen, die oftmals völlig unspezifisch wirken, sodass sie gegenüber Infektionen und vor allem viral induzierten Tumorerkrankungen anfälliger sind. Folglich ist es für die Erhöhung der Organakzeptanz von essentieller Bedeutung die molekularen Mechanismen des Immunsystems bei einer Abstoßungsreaktion zukünftig besser zu verstehen, um gezielte Therapieansätze zu entwickeln.

1.1 GRUNDLAGEN DER TRANSPLANTATIONSIMMUNOLOGIE

1.1.1 Begriffsdefinition der Transplantation

Unter Transplantation versteht man die Übertragung von Zellen, Geweben oder Organen (den Transplantaten) von einem Spender (Donor) auf einen Empfänger (Rezipienten). Bei identischem Spender- und Empfängermaterial spricht man von einer Autotransplantation (z.B. Hauttransplantation). Syngene Transplantationen sind Organverpflanzungen zwischen genetisch identischen Individuen (eineiige Zwillinge bzw. Inzuchtstämme); das Transplantat wird dabei als Isotransplantat bezeichnet. Bei Allotransplantationen, die häufigste Form der Organtransplantation, wird ein sogenanntes Allotransplantat zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen einer Spezies übertragen. Xenogene Organverpflanzungen hingegen sind Transplantationen zwischen verschiedenen Spezies. Bei einer orthotopen Transplantation werden die Spenderorgane in ihre ursprüngliche anatomische Lage verpflanzt. Bei einer heterotopen Transplantation wird das Organ in einen nicht natürlichen anatomischen Ort implantiert.

1.1.2 Mechanismen der Transplantatabstoßung

Die Entstehung der Transplantationsimmunologie als neue wissenschaftliche Disziplin resultierte aus den Erkenntnissen der experimentellen und klinischen Transplantationen. Durch ihre tierexperimentellen Untersuchungen bei allogenen Hauttransplantationen legten Peter Medawar und Thomas Gibson die Grundlagen für das immunologische Verständnis der Abstoßungsreaktionen und der Organtoleranz. Sie wiesen nach, dass die immunologische Sensibilisierung spenderspezifisch ist, d.h. beim erneuten Kontakt mit demselben Gewebe läuft eine wesentlich schnellere und heftigere Reaktion ab. Beim Kontakt mit Gewebe von anderen Spendern hingegen läuft die Reaktion genauso wie beim ersten Aufeinandertreffen ab [Gibson, 1943; Medawar, 1944 und 1945]. Heute weiß man, dass sich die Immunantwort gegen Transplantate aus vielen Prozessen zusammensetzt, zu denen die lokale Entzündung und die Antigenerkennung gehören. Als fremd werden dabei vor allem die Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl. Major Histocompatibility Complex), beim Menschen auch als HLA (engl. Human Leucocyte Antigen) bezeichnet, erkannt, welche auf den allogenen Spenderzellen exprimiert werden. Dabei beeinflusst der MHC-Komplex sowohl adaptive als auch natürliche Immunantworten. Zum einen werden auf MHC-Molekülen die Alloantigene des Spenders den Empfänger-T-Lymphozyten als „fremd“ präsentiert, was zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen und somit zur Initiierung des erworbenen Immunsystems führt. Des Weiteren erkennen die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) der Rezipienten antigenunabhängig

das Fehlen von eigenen MHC-Molekülen auf dem Donorgewebe und leiten über natürliche Immunantworten die Schädigung des Transplantates ein. Bei der Beschreibung der Abstoßungsmechanismen müssen daher sowohl die natürliche als auch die adaptive Komponente des Immunsystems in Betracht gezogen werden.

Weiterhin wird zwischen verschiedenen Abstoßungsreaktionen unterschieden:

Die **hyperakute Transplantatabstoßung** beruht auf einer Antikörperreaktion, die innerhalb von wenigen Minuten intraoperativ zum sofortigen Verlust des Transplantates führen kann. Dabei bewirken präformierte Alloantikörper aus vorangegangenen Transplantationen, Bluttransfusionen oder Schwangerschaften durch Erkennung der Blutgruppenantigene und polymorphen MHC-Antigene eine Abstoßung des Transplantats [Kupiec-Weglinski und Hancock, 1996]. Die Einführung von präoperativen Tests zum Nachweis kreuzreagierender Antikörper können heutzutage diese schnellen Abstoßungsreaktionen vermeiden.

Die **akzelerierte Abstoßung** ist B- und T-Zell-vermittelt und tritt nach Stunden bis Tagen auf. Sie beruht auf einer früheren Sensibilisierung des Empfängers gegen die spenderspezifischen Antigene [Chapman *et al.*, 1986; Jordan *et al.*, 1988; Schuurman *et al.*, 1988]. Als Risikofaktoren werden auch hier frühere Organtransplantate, Bluttransfusionen und Schwangerschaften angesehen.

Die **akute Transplantatabstoßung** ist eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität nach soliden Organtransplantationen. Sie beginnt zwischen den ersten Tagen bis Wochen nach der Organverpflanzung und wird vor allem durch alloantigenspezifische T-Zellen vermittelt. Es kommt zur Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und neben den T-Zellen auch von Monozyten, Makrophagen, NK- und B-Zellen, welche daraufhin Zytokine und Wachstumsfaktoren produzieren. Hierbei erfolgt eine ausgeprägte Infiltration der Lymphozyten des Empfängers in das Fremdgewebe, die schließlich zu einer Endothelschädigung des Organs führen. Treten mehrere akute Abstoßungsepisoden auf, kommt es zur Ausbildung einer humoralen Immunität, welche gegen die Antigene des Spenders gerichtet ist.

Die **chronische Abstoßung** ist ein langsam fortschreitender Prozess und tritt erst Monate bis Jahre nach der Transplantation auf und stellt inzwischen das Hauptproblem für Langzeiterfolge dar [Orloff *et al.*, 1995]. Der Funktionsverlust des Organs nach einer chronischen Rejektion ist durch eine Fibrose und Sklerose gekennzeichnet. Ursache hierfür sind Entzündungsreaktionen, die durch CD4⁺ T-Helferzellen, B-Zellen und aktivierte Makrophagen hervorgerufen werden [Lowry, 1996]. Eine akute Abstoßungsepisode erhöht selbst bei erfolgreicher Therapie das spätere Risiko für die Entwicklung des chronischen Organfunktionsverlustes [Taylor *et al.*, 1992; Orbaek Anderson, 1999; Azuma und Tilney, 1996].

1.1.2.1 T-Zell-vermittelte Immunantwort bei der Transplantatabstoßung

Die Immunreaktionen werden durch T- und B-Lymphozyten vermittelt. T-Zellen sind hauptsächlich für die zellvermittelte Immunität verantwortlich, die auch eine wichtige Rolle bei der akuten Abstoßung spielt. B-Zellen vermitteln hingegen die humorale, antikörperabhängige Immunantwort, die sowohl bei der akuten als auch der chronischen Abstoßung beteiligt ist. Zusätzlich zur antigenspezifischen Immunantwort tragen weitere Zellen wie NK-Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten zur Transplantatabstoßung bei.

Immunantworten, die durch T-Lymphozyten vermittelt werden, erfordern eine Aktivierung durch zwei synergistische Signale. Das erste Signal wird über die Interaktion vom T-Zellrezeptor (TCR) mit dem MHC-Peptid-Komplex auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC) ausgelöst. Das zweite Signal wird durch die Ligation eines kostimulatorischen Moleküls auf derselben T-Zelle vermittelt, welches die Signalweiterleitung des TCR verstärkt und kontrolliert [Crow, 2004; Frauwirth und Thopson, 2002; Hurwitz *et al.*, 2000]. Nur die Bindung des TCR an den MHC-Peptid-Komplex bei gleichzeitiger Kostimulation führt zu einer effektiven Aktivierung der T-Zelle. Die MHC-Proteine sind in zwei Subklassen unterteilt, die MHC-Klasse-I- (MHC-I) und MHC-Klasse-II-Antigene (MHC-II). Die MHC-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren den CD8⁺ T-Zellen Peptide, welche vor allem im Zytosol aus endogen produzierten Antigenen prozessiert wurden. MHC-Klasse-II-Moleküle werden hingegen gewebe- und zellspezifisch auf APCs exprimiert und präsentieren den CD4⁺ T-Zellen Peptide vor allem exogen aufgenommener Antigene, die in zellulären Vesikeln abgebaut wurden. Bei einer Transplantation sind es die Allo- bzw. Xenoantigene, welche als fremd erkannt werden. T-Zellen spielen sowohl in der Initiierung als auch in der Koordination einer Abstoßungsreaktion eine wesentliche Rolle. Die Präsentation der Fremdantigene an die T-Helferzellen kann dabei über den direkten oder indirekten Weg erfolgen (s. Abb. 1). Bei der indirekten Alloerkennung werden die vom allogenen Spendergewebe stammenden Proteine von den APCs des Empfängers prozessiert und als Peptide über Selbst-MHC-Moleküle präsentiert. Werden die körperfremden MHC-Proteine hingegen direkt auf den Donor-APCs als fremd erkannt, bezeichnet man dieses als direkte Alloantigenerkennung [Sayegh *et al.*, 1994; Gould und Auchincloss, Jr., 1999]. Hierbei findet eine Kreuzreaktivität der TCRs statt, d.h. entweder erfolgt eine peptiddominierte Bindung, bei der die Wechselwirkung zwischen Fremd-Peptid und Empfänger TCR so stark ist, dass der TCR auch an Spender-MHC-Moleküle binden kann. Alternativ findet eine MHC-dominierte Wechselwirkung über eine starke Bindung an bestimmte Bereiche des Donor-MHC-Moleküls, unabhängig vom gebundenen Peptid statt. Die Antigenerkennung durch die T-Zelle bei gleichzeitigem

Erhalt kostimulatorischer Signale führt zu deren Aktivierung mit anschließender Proliferation. Alloaktivierte $CD4^+$ T-Helferzellen interagieren anschließend mit Effektorzellen des Immunsystems durch Zytokinproduktion oder direkte Zell-Zell-Kontakte. Durch die Aktivierung von B-Zellen, $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen fördern die alloaktivierten $CD4^+$ T-Zellen die Produktion von Alloantikörpern, antigenspezifische Zelllyse und Gewebeschädigung im Sinne einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion. Die zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen wirken nach Antigenerkennung durch direkten Zell-Zell-Kontakt lytisch auf ihre Zielzelle und induzieren somit deren Apoptose. Das Zusammenspiel dieser Effektormechanismen resultiert schließlich in der Zerstörung des Transplantats [Denton *et al.*, 1999].

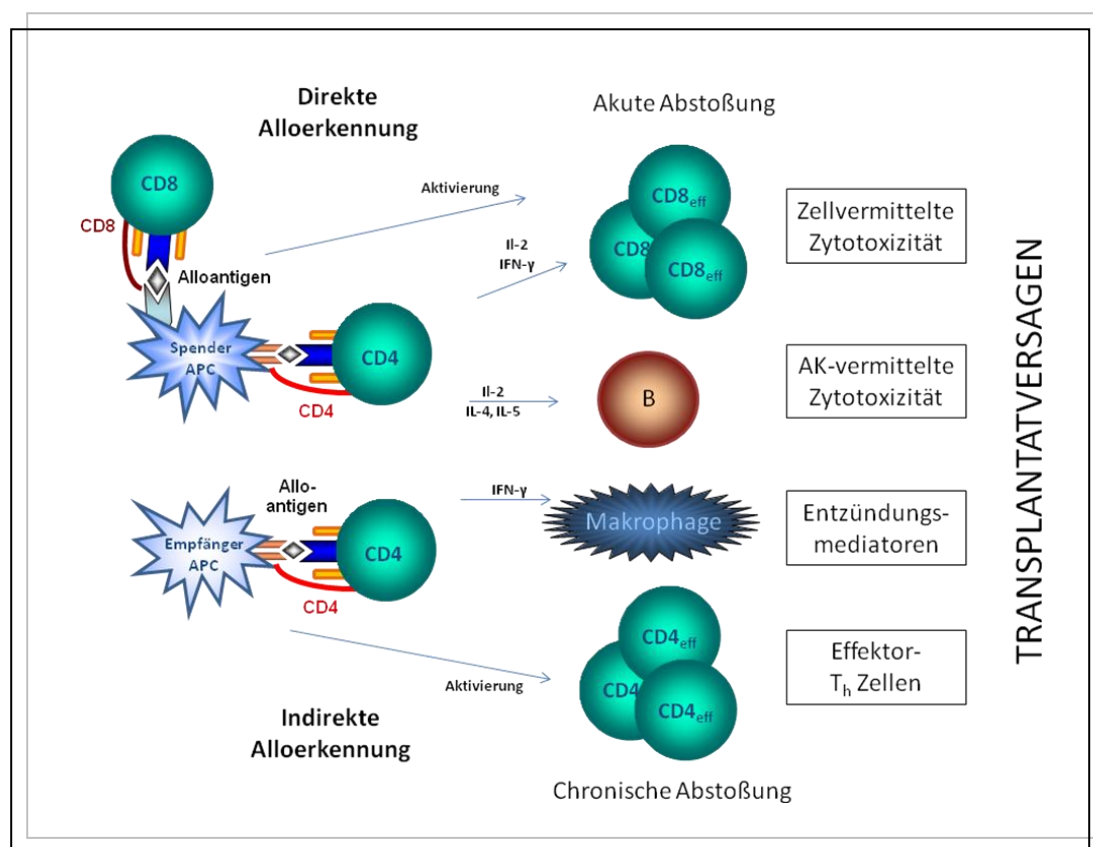


Abb. 1: Mechanismen der Transplantatabstoßung

Die direkte und indirekte Alloerkennung führen zur Aktivierung von T-Zellen, welche zytotoxische T-Zellen zur Perforin-/Granzyme B vermittelten Lyse oder Induktion der Apoptose aktivieren. Gleichzeitig setzt durch freigesetzte Zytokine die humorale Immunantwort der B-Zellen durch Produktion von Alloantikörpern, die zur Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität führen, ein. Ebenso werden Makrophagen rekrutiert und aktiviert, die wiederum Entzündungsmediatoren freisetzen, die Gewebe schädigen und zur weiteren Aktivierung von T-Zellen beitragen. (Modifiziert nach Binah, 1994 und Denton *et al.* 1999).

Die direkte Alloerkennung spielt in der Frühphase nach der Allotransplantation und damit für die akuten Rejektionsformen eine dominantere Rolle, denn es wird ein erheblich größerer Anteil an peripheren, alloreaktiven T-Zell-Klonen generiert, als dies bei Immunantworten gegen konventionelle Antigene der Fall ist: Zwischen 1% und 10%

der T-Zellen im peripheren Blut sind in der Lage, ein bestimmtes Alloantigen zu erkennen [Wilson und Nowell, 1971; Jones, 1973; Krensky *et al.*, 1990]. Aus diesem Grund sollten immunsuppressorische Therapien direkt nach der Transplantation beginnen. Mit Absterben der Spender-APCs und Infiltration des Transplantates mit Empfänger-APCs wird der indirekte Weg wichtiger, der jedoch weniger immunogen ist. Es gibt aber Hinweise darauf, dass dieser Mechanismus zu der schleichenden Immunantwort führt, die in der chronischen Abstoßung auftritt [Vella *et al.*, 1997].

1.2 EINFLUSS DER IMMUNSUPPRESSION

Moderne Immunsuppressiva sind heute in den meisten Fällen in der Lage, akute Abstoßungsreaktionen zu kontrollieren. Die derzeit in der Transplantation verwendeten immunsuppressiven Medikamente hemmen die T-Zellaktivierung, die Zytokinproduktion, die klonale Expansion von Lymphozyten bzw. setzen sich deren Wirkweisen aus einer Kombination dieser Mechanismen zusammen. Neben chemotherapeutischen Arzneimitteln werden zur immunsuppressiven Therapie ebenfalls Antikörper eingesetzt, die Lymphozyten oder deren Untergruppen depletieren oder die Interaktion von bestimmten Oberflächenmolekülen verhindern.

Calcineurin ist eine calciumabhängige Phosphatase, die nach Aktivierung über den T-Zellrezeptor Transkriptionsfaktoren wie NFAT (engl. Nuclear Factor of Activated T-cells) dephosphoryliert. Nach dessen Dephosphorylierung dringt NFAT in den Zellkern ein und aktiviert die mRNA-Synthese von Interleukin 2 (IL-2). Die Calcineurininhibitoren Cyclosporin und Tacrolimus binden an zytoplasmatische Rezeptoren (Cyclophilin bzw. FK-bindendes Protein). Die gebildeten Komplexe hemmen die Aktivierung von Calcineurin, sodass kein NFAT in den Zellkern eintritt und somit keine IL-2 Genaktivierung initiiert wird. Die Hemmung von Calcineurin führt zu einer Reduktion der IL-2 Produktion und damit zur Inhibierung der T-Zellaktivierung und -proliferation [Perico und Remuzzi, 1997; Bush, 1999].

Antimetabolite wie Azathioprin oder Mykophenolat-Mofetil (MMF) interferieren mit der DNA-Synthese und inhibieren so die Zellproliferation von B- und T-Zellen. Azathioprin gehört zur Gruppe der Zytostatika und wird in der Leber fast vollständig in 6-Mercaptopurin umgewandelt. Über den „salvage pathway“ wird dieser in den aktiven Metaboliten 6-Mercaptopurinribonukleotid umgewandelt. Intrazellulär wird der aktive Metabolit als Purinanalogon anstelle von Adenin und Guanin eingebaut, was beim Ablesen der Kette zu einem Strangabbruch der DNA oder RNA führt und zur Hemmung der Proteinsynthese und der T-Zellproliferation. Mycophenolsäure (MPA),

der Metabolit des MMF, hemmt reversibel die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH). Diese ist das Schlüsselenzym der *de novo* Purinbiosynthese und somit für die Proliferation von Lymphozyten. [Bush, 1999; Gummert *et al.*, 1999].

In der Transplantationsmedizin werden Antikörper eingesetzt, um Lymphozyten zu depletieren oder um die Interaktionen von spezifischen Oberflächenmolekülen zu blockieren. Der monoklonale Antikörper Muromonab-CD3 (OKT3) ist ein gegen humanes CD3 gerichteter muriner Antikörper. Er bindet spezifisch an die ϵ -Kette des CD3-Moleküls, welches für die Signaltransduktion des T-Zellrezeptors verantwortlich ist und somit zur Depletion der reifen CD3⁺ T-Zellen führt. Basiliximab und Daclizumab sind humanisierte monoklonale Antikörper, die gegen die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) gerichtet sind und somit die Proliferation der aktivierten T-Zellen verhindern. Polyklonale Antikörper wie Antithymozytenglobuline (ATG) sind ein Gemisch aus Antikörpern, die gegen verschiedene Epitope auf T-Zellen gerichtet sind. ATG ist ein polyklonales Kaninchen- oder Pferdeserum, das durch Aufreinigung der Immunglobuline nach Immunisierung mit humanem lymphatischem Gewebe gewonnen wird. Der Hauptwirkmechanismus von ATG ist die T-Zelldepletion, die durch eine komplementabhängige Lyse und durch Induktion von Apoptose ausgelöst wird [Zand *et al.*, 2006].

1.2.1 Induktion einer Transplantat-Toleranz durch Immunsuppressiva

Der große Nachteil der verwendeten immunsuppressiven Mittel besteht in der unspezifischen Unterdrückung sowohl schützender als auch schädigender Funktionen des Immunsystems. Aufgrund der lebenslangen Immunsuppression entwickeln viele Patienten opportunistische Infektionen und maligne Tumore, die nicht selten zum Tod führen [Gottlieb *et al.*, 2004]. Ebenso haben medikamententoxische Schädigungen vor allem der Nierenfunktion, insbesondere unter Therapie mit Calcineurininhibitoren, einen erheblichen Einfluß auf den Langzeitverlauf nach der Transplantation. Die vielversprechendste Alternative zur lebenslangen systemischen Immunsuppression stellt die Induktion einer spenderspezifischen Toleranz dar. Die Fähigkeit des Immunsystems, „fremd“ von „selbst“ zu unterscheiden und so Autoantigene zu ignorieren, wird als immunologische Selbsttoleranz bezeichnet. Es existieren verschiedene Mechanismen, die zur Induktion einer peripheren Transplantattoleranz führen und somit als Ansätze für immunsuppressive Therapien dienen:

Unter Einbeziehung des Mechanismus der Deletion entwickelte Roy Calne das Konzept der „Prope“ Toleranz [Calne *et al.*, 1998; Calne *et al.*, 1999]. Durch niedrig dosierte, nebenwirkungsarme immunsuppressive Monotherapie sollte ein nahezu (lateinisch prope) toleranter Zustand für die Akzeptanz des Transplantates erreicht werden.

Campath H1 (Alemtuzumab), ein humanisierter monoklonaler Antikörper, mit Spezifität gegen das auf Lymphozyten und Monozyten exprimierte Molekül CD52, stellte dabei in klinischen Studien ein wirkungsvolles Mittel dar. Campath H1 führt über eine antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität zur Depletion von T-, B- und Dendritischen Zellen [Riechmann *et al.*, 1988; Buggins *et al.*, 2002].

Die Kontrolle autoreaktiver Lymphozyten kann im peripheren Immunsystem auch aktiv durch spezialisierte Zellen erfolgen. Regulatorische T-Zellen (Treg) exprimieren die Oberflächenmoleküle CD4, CD25 sowie intrazellulär FoxP3 und verhindern effektiv die T-Zellaktivierung [Shevach *et al.*, 2001; Thornton und Shevach, 1998; Brunkow *et al.*, 2001]. Hinweise für das Vorhandensein suppressiver Mechanismen erhielt man aus adoptiven Zelltransferexperimenten, bei welchen die antigenspezifische Toleranz der T-Lymphozyten von tolerisierten Tieren auf naive Empfängertiere übertragen werden konnte [Qin *et al.*, 1993; Graca *et al.*, 2002a]. Für die Zukunft besteht daher die Hoffnung, dass *in vitro* expandierte autologe antigenspezifisch wirkende FoxP3⁺ Tregs zur Therapie von Autoimmun- und Allotransplantatpatienten eingesetzt werden können, um die breit und unspezifisch wirkenden Immunsuppressiva zu ersetzen.

Das CTLA-4-Ig Fusionsprotein, welches aus dem extrazellulären Bereich von CTLA-4 und dem Fc-Teil der schweren Kette eines Immunglobulin-Moleküls besteht [Linsley *et al.*, 1992b] nutzt das Prinzip der Anergie für seine immunsuppressive Wirkung. Erfährt eine T-Zelle eine Stimulation ausschließlich über seinen TCR ohne gleichzeitiges kostimulatorisches Signal, führt dieses zu einer funktionellen Inaktivierung der Zellen (Anergie) [Jenkins und Schwartz, 1987]. Darüber hinaus kann der Zustand der Anergie auch aktiv über inhibitorische Rezeptoren wie z.B. CTLA-4 induziert werden. Bei der *in vivo* Applikation von CTLA-4-Ig wird für die Blockade des kostimulatorischen Signals von B7/CD28-Interaktionen die sehr viel höhere Bindungsaffinität von CTLA-4 an B7- im Vergleich zu CD28-Molekülen genutzt. Die inhibitorische Wirkung führt zum Zellzyklusarrest und/oder hemmt die Zytokinproduktion. Aus verschiedenen Molekülvarianten mit alternativen Aminosäuresubstituenten isolierte die Fa. Bristol Meyer Squibb die von ihr als LEA29Y (Belatacept) bezeichnete CTLA-4-Ig Variante, welche eine deutlich höhere Bindungsaffinität für B7-Moleküle aufweist als das natürliche CTLA-4 Molekül. Eine klinische Phase-II-Studie konnte die Effektivität nach Nierentransplantation bereits eindrucksvoll belegen [Vincenti *et al.*, 2005]. Belatacept hatte die gleiche Effektivität wie Cyclosporin in einer Kombinationstherapie mit MMF und Basiliximab. Auch das Nebenwirkungsprofil zeichnete sich durch eine gute Verträglichkeit der Patienten auf das Medikament aus.

1.3 DIE NATÜRLICHE IMMUNANTWORT IN DER TRANSPLANTATABSTOßUNG

Während bereits gezeigt wurde, dass die Mechanismen des adaptiven Immunsystems die Abstoßung von soliden Organen vermitteln und als Grundlage für zahlreiche immunsuppressive Therapien dienen, wurde die klinische Relevanz der angeborenen Immunität (z.B. NK-Zellen) nur unzureichend untersucht [Kitchens *et al.*, 2006].

1.3.1 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) weisen zwei entscheidende Merkmale auf, die sie in Verbindung mit Abstoßungsreaktionen bringen: Sie können zwischen eigenen und fremden Zellen unterscheiden und bei Aktivierung zytotoxische Effektormechanismen vermitteln.

Natürliche Killerzellen bilden neben den T- und B-Zellen die dritte Unterklasse der Lymphozyten und wurden 1975 entdeckt [Kiessling *et al.*, 1975a, b; Herberman *et al.*, 1975]. NK-Zellen werden im humanen System phänotypisch über die Abwesenheit des CD3 T-Zellrezeptors und die Expression des CD56 und CD16 Rezeptors [Cooper *et al.*, 2001] charakterisiert. Murine NK-Zellen exprimieren den NK-Zell-spezifischen NKp46 Rezeptor, CD122, NK1.1 und/oder DX5 Oberflächenmoleküle [Moretta *et al.*, 2000; Colucci *et al.*, 2003]. Natürliche Killerzellen machen 10 – 15% der zirkulierenden Lymphozyten im Blut aus und sind vor allem auch in der Milz, im Knochenmark, der Leber, den Lymphknoten, der Lunge, im Gastrointestinaltrakt und der Plazenta anzutreffen [Colucci *et al.*, 2003]. Im Gegensatz zu B- und T-Zellen zählen NK-Zellen allgemein zu den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Sie erlangen kein immunologisches Gedächtnis im Rahmen der adaptiven Immunität und lysieren infizierte oder transformierte Körperzellen ohne vorherige Sensibilisierung, schon bevor das spezifische Immunsystem reagiert [Moretta *et al.*, 1996; Lanier *et al.*, 1998]. NK-Zellen nutzen zwei verschiedene Mechanismen, um ihre Zielzellen abzutöten: den Perforin/Granzym vermittelten Weg über die direkte zytotoxische Aktivität [Henkart, 1985; Smyth *et al.*, 1999] und den nicht sekretorischen Pfad über die Interaktion zwischen FasL und Fas [Trauth *et al.*, 1989; Arase *et al.*, 1995]. Anders als T-Zellen, können NK-Zellen schnell und effizient Zytokine produzieren, zu denen IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-1, TGF- β , IL-10 gehören [Trinchieri, 1989]. Über die Bildung dieser Zytokine tragen die NK-Zellen zu der Regulation des Immunsystems im frühen Stadium einer Immunabwehr bei und beeinflussen die Entwicklung spezifischer T- und B-Zellantworten. So werden diese Zellen als die erste Verteidigungslinie bei der Abwehr bestimmter Viren, intrazellulärer Bakterien, Pilze, Parasiten und bei der Abwehrreaktion gegen bestimmte Tumorzellen angesehen [Hamerman *et al.*, 2005; Kiessling *et al.*, 1975; Biron und Brossay, 2001].

1.3.1.1 NK-Zellrezeptoren

Der Großteil der Rezeptoren von NK-Zellen wird MHC-Klasse-I (MHC-I) abhängig aktiviert. Die Gruppe der MHC-I spezifischen NK-Zellrezeptoren wird nach ihrer Substanzklasse in Lektin-ähnliche und Immunglobulin-(Ig)-ähnliche Rezeptoren unterteilt. Während die Ig-ähnlichen KIRs (engl. Killer cell Immunglobuline-like Receptors) nur im Menschen nachgewiesen werden konnten [McQueen und Parham, 2002], wurden in der Maus die funktionellen Homologe in den C-Typ-Lektin-ähnlichen Ly49 Rezeptoren entdeckt [Yokoyama und Seaman, 1993].

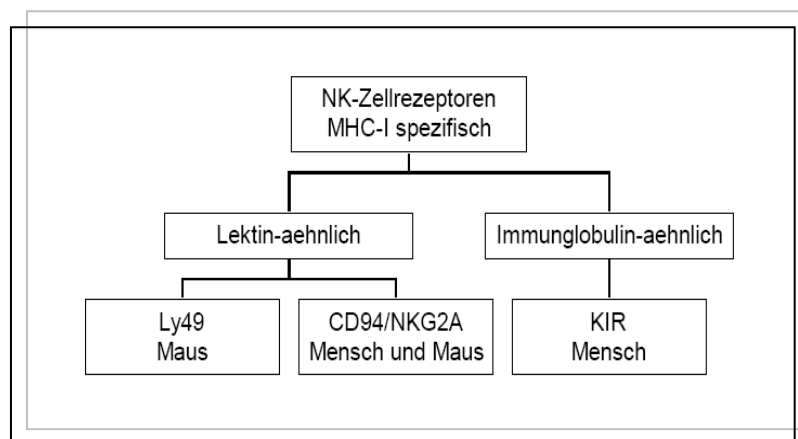


Abb. 2: Einteilung MHC-Klasse-I spezifischer NK-Zellrezeptoren

MHC-Klasse-I abhängige NK-Rezeptoren lassen sich in Lektin- und Ig-ähnliche Rezeptoren unterteilen. Murine Ly49 Rezeptoren gehören zur Familie der Lektin-ähnlichen Rezeptoren. Im humanen System konnten die homologen KIR Rezeptoren der Immunglobulin Familie identifiziert werden. CD94/NKG2A werden sowohl im Menschen als auch in der Maus exprimiert.

1.3.1.1.1 MHC-I-spezifische Ly49 Rezeptoren

Die Ly49 Rezeptoren werden im Chromosom 6 der Maus auf dem NK-Komplex (NKC) kodiert [Yokoyama und Plougastel, 2003] und erscheinen in den ersten 6 Wochen nach der Geburt auf der Zelloberfläche [Kubota *et al.*, 1999]. Bisher konnten 17 dieser Rezeptoren identifiziert werden und wurden als Ly49 A – P, W benannt [McQueen *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1991]. Jedes Individuum hat ein unterschiedliches NK-Zellrepertoire, das MHC-I-spezifische Rezeptoren für eigene, aber auch fremde MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche enthält [Valiante *et al.*, 1997a]. Die murine NK-Zelle trägt meist 2 – 3 verschiedene Ly49 Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche und die Verteilung erfolgt zunächst zufällig und monoallel, unabhängig vom Vorhandensein eines passenden Liganden [Held *et al.*, 1995, 1997, 1998, 1999]. Die Rezeptorexpression wird jedoch noch MHC-Klasse-I abhängig modifiziert [Raulet *et al.*, 2001]. So wird der Rezeptor in höherer Dichte und auf mehr Zellen exprimiert,

wenn im Wirt kein Ligand vorhanden ist bzw. die Rezeptordichte herunterreguliert, wenn Zielzellen den Rezeptor für die entsprechenden MHC-I-Moleküle anbieten [Korten *et al.*, 1999; Hanke *et al.*, 2001]. Generell lassen sich die Ly49 Gene in Rezeptoren mit aktivierenden und inhibitorischen Spezifitäten unterteilen:

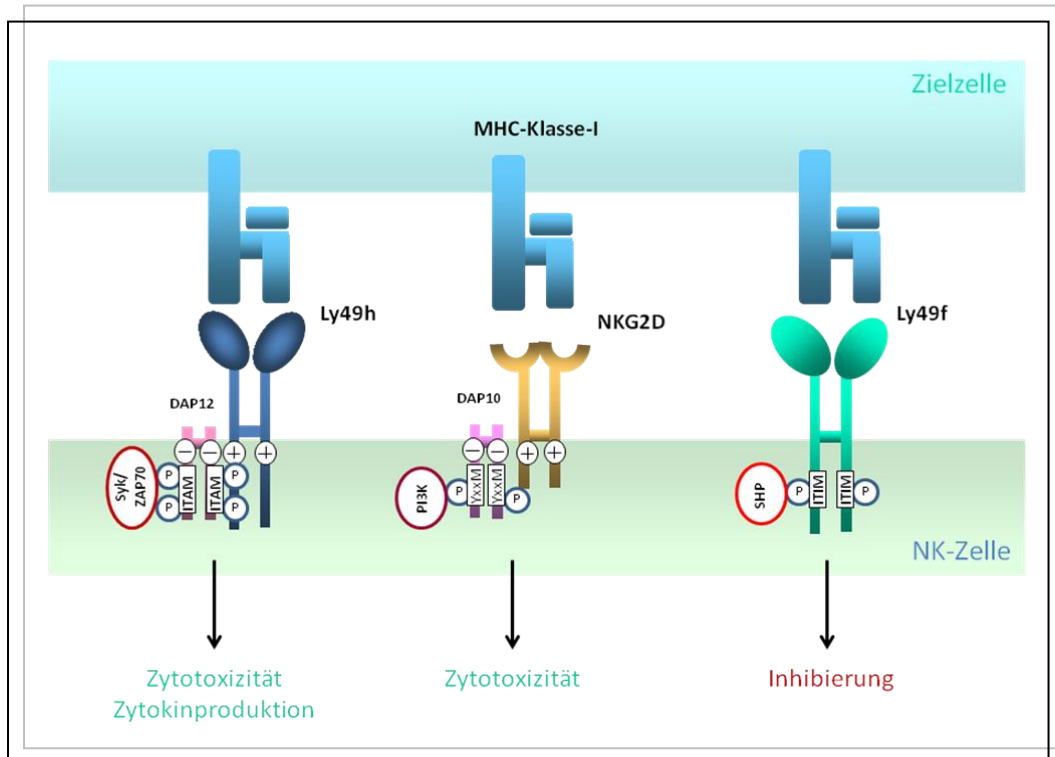


Abb. 3: Signalweiterleitung von aktivierenden und inhibitorischen NK-Rezeptoren

Aktivierende NK-Rezeptoren assoziieren mithilfe einer positiv geladenen Aminosäure in der Transmembranregion mit Adaptermolekülen wie DAP12 und DAP10, die über den Syk/ZAP70-vermittelten Signalweg Zytotoxizität und Zytokinproduktion der NK-Zelle aktivieren bzw. über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) die Zytotoxizität einleiten. Inhibierende NK-Rezeptoren besitzen ITIM Sequenzen in der Zytoplasmaregion, deren Phosphorylierung zur Rekrutierung der Tyrosinphosphatase SHP führt.

Modifiziert nach Yokoyama und Plougastel, 2003

a) Inhibierende Rezeptoren

Inhibierende Rezeptoren enthalten in ihrem zytoplasmatischen Teil eine oder mehrere ITIM Domänen (engl. Immunoreceptor Tyrosin Based Inhibitory Motif), die ein Bindungsmotiv für SHP-1- und SHP-2-Phosphatasen darstellen (s. Abb. 3). Während der Rezeptor-Liganden-Interaktion werden die ITIM Motive durch die Proteintyrosinkinase phosphoryliert und binden dann an die SH2-Domänen der Tyrosinphosphatasen SHP-1 oder SHP-2. Die aktivierten Phosphatasen dephosphorylieren Adapter- bzw. Effektor-Moleküle des aktivierenden Signaltransduktionsweges und unterbinden somit durch aktivierende Rezeptoren vermittelte, positive Signale [Tomasello *et al.*, 2000]. Experimente mit NK-Zellklonen zeigten, dass NK-Zellen mindestens einen hemmenden

Rezeptor exprimieren, der spezifisch für einen eigenen MHC-Klasse-I-Ligand ist („at least one theory“) [Raulet *et al.*, 2001; Valiante, 1997].

Bei Mäusen konnten den Rezeptoren Ly49 A-C, E-G, I-O inhibitorische Aufgaben in der NK-Zellaktivierung nachgewiesen werden.

b) Aktivierende Rezeptoren

Aktivierende NK-Zellrezeptoren besitzen einen sehr kurzen zytoplasmatischen Abschnitt, welcher mit dem Adapterprotein DAP12 assoziiert ist (s. Abb. 3). DAP12 besitzt ITAM Domänen (engl. Immunoreceptor Tyrosin Based Activating Motif), die durch Proteintyrosinkinasen phosphoryliert werden und eine aktivierende Signalkaskade in Gang setzen können [Campbell und Colonna, 1999].

Als wichtige Vertreter der aktivierenden Rezeptoren bei Nagern wurden Ly49 D, H, P, NKG2D und NKp46 identifiziert, wobei NKG2D und NKp46 nicht MHC-I-abhängig aktiviert werden (s. Kapitel 1.3.1.3).

Liganden der Ly49 Rezeptoren in der Maus sind die klassischen MHC-I-Moleküle H2-K, H2-D und H2-L [Hanke *et al.*, 1999; Makrigiannis *et al.*, 2001]. Ly49 Rezeptoren erkennen jedoch nicht nur die Expression von MHC-I-Molekülen, sondern differenzieren auch zwischen verschiedenen Allotypen, indem sie jeweils bestimmte Gruppen von MHC-Klasse-I-Molekülen binden. Im Gegensatz zum T-Zellrezeptor scheint die Bindung von Ly49 Rezeptoren an ihre MHC-I-Liganden größtenteils unabhängig vom gebundenen Peptid zu sein [Correa und Raulet, 1995]. Die spezifischen Bindungspartner der Ly49 Moleküle sind bisher nur zum Teil bekannt (s. Tabelle).

Rezeptor	Aktivierend/ Inhibierend	Liganden	Referenzen
Ly49A	Inhibierend	H-2D ^d , D ^k , D ^p , D ^q , L ^q	Karlhofer <i>et al.</i> , 1992; Kane, 1994; Yu <i>et al.</i> , 1996; Matsumoto <i>et al.</i> , 2001; Olsson-Alheim <i>et al.</i> , 1999
Ly49C/I	Inhibierend	H-2K ^b , D ^b , H-2D ^d	Brennan <i>et al.</i> , 1994; Yu <i>et al.</i> , 1996; Michaelsson <i>et al.</i> , 2000
Ly49D	Aktivierend	H-2D ^d , D ^r , D ^{sp2}	George <i>et al.</i> , 1999
Ly49G2	Inhibierend	H-2D ^d , L ^d	Mason <i>et al.</i> , 1995
Ly49H	Aktivierend	m157	Arase <i>et al.</i> , 2002
Ly49P	Inhibierend	H-2D ^d	Silver <i>et al.</i> , 2000
Ly49W	Inhibierend	H-2D ^d , H-2D ^k	Silver <i>et al.</i> , 2001

Für den aktivierenden Rezeptor Ly49H konnte bis heute kein MHC-I-Ligand identifiziert werden. Ly49H erkennt hingegen das Protein m157, ein virales Glykoprotein, welches auf mit murinem Cytomegalovirus (MCMV) infizierten Zellen exprimiert wird [Arase *et al.*, 2002].

1.3.1.2 Die Regulation der NK-Zelle

Die zytolytische Aktivität und die Zytokinsekretion von Natürlichen Killerzellen werden über die positiven und negativen Signale reguliert, welche über die aktivierenden oder inhibierenden NK-Zellrezeptoren vermittelt werden [Lanier, 2003]. Hierbei erfolgt die Regulation der NK-Zellaktivierung über ein Gleichgewicht zwischen inhibierenden und aktivierenden Signalen [Raulet *et al.*, 2001]. Überwiegen Liganden für inhibitorische Rezeptoren auf der Zielzelle, bleibt die NK-Zelle inhibiert und wird nicht aktiviert. Fehlen jedoch diese hemmenden Signale und überwiegen Liganden für aktivierende Rezeptoren, werden die NK-Zellen aktiviert und leiten die Zellyse der Target-Zellen ein.

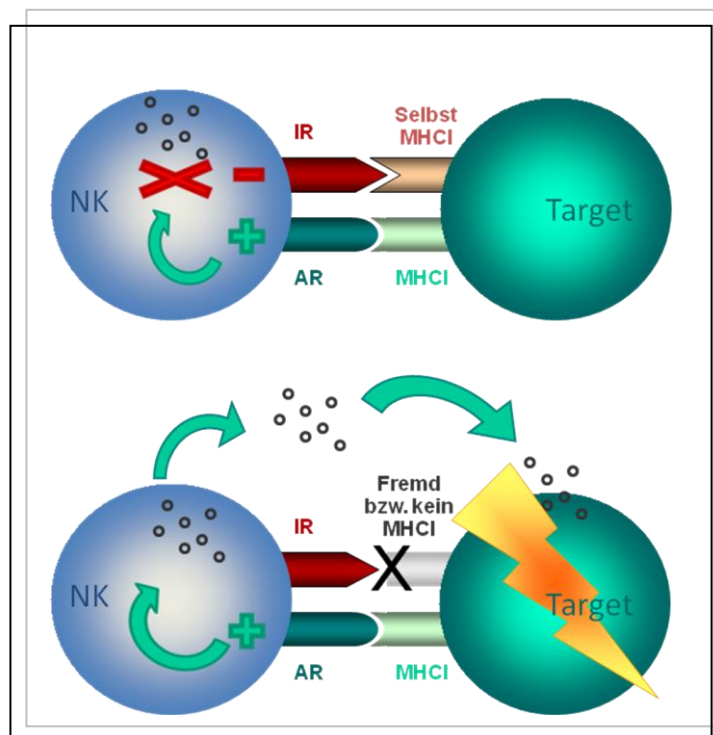


Abb. 4: „Missing-self“ Hypothese

NK-Rezeptoren binden MHC-I-Moleküle auf den Targetzellen. Die NK-Zellaktivität unterliegt dabei einem fein ausbalancierten Wechselspiel inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren. Im Ruhezustand überwiegt das inhibitorische Signal. Eine Zielzellyse wird hingegen durch Fehlen von eigenen inhibitorischen Rezeptoren ausgelöst oder bei Zunahme des aktivierenden Signals.

IR: Inhibierender Rezeptor

AR: Aktivierender Rezeptor

Modifiziert nach Ljunggren und Kärre, 1990

Ljunggren und Kärre beobachteten, dass durch Mutagenese generierte MHC-I-defiziente Lymphomzelllinien von C57BL/6 Mäusen abgestoßen wurden, während die entsprechenden MHC-I-positiven Zelllinien zum Tumorwachstum führten. Weiterhin konnten sie zeigen, dass dieser Effekt durch NK-Zellen vermittelt wurde, da die Abstoßung sich auch durch vorherige Depletion von Asialo-GM1⁺ oder NK1.1⁺ Zellen im Empfängertier verhindern ließ. Basierend auf diesen Beobachtungen, formulierten sie die „missing-self“ Hypothese (s. Abb. 4). Diese besagt, dass NK-Zellen autologe Zielzellen mit fehlender oder alterierter MHC-Klasse-I-Expression erkennen und abtöten, sofern sie nicht durch die Bindung von eigenem MHC-Klasse-I-Molekülen an inhibierende NK-Rezeptoren daran gehindert werden [Ljunggren und Kärre, 1990; Lindberg *et al.*, 1999]. Eine weitere Arbeit zur Spezifität von NK-Zellen wurde von Becker *et al.* beschrieben. YAC-1 Zellen aus *in vitro* Kulturen, die mit IFN- γ inkubiert wurden, sind vor NK-Zellen autologer Mäuse geschützt. Dieser Schutz kann jedoch durchbrochen werden, indem die Zellen in Abwesenheit von IFN- γ kultiviert werden, wodurch die MHC-Klasse-I-Expression von YAC-1 Zellen deutlich reduziert wird [Becker *et al.*, 1978].

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

1.3.1.3 Der nicht-MHC-reaktive aktivierende Rezeptor „NKp46“ (NCR1)

Moretta *et al.* beschrieben drei Ig-ähnliche Rezeptoren auf NK-Zellen, welche eine nicht MHC-I-abhängige Zytotoxizität vermitteln [Moretta *et al.*, 2000]. NKp46, NKp44 und NKp30 werden allgemein in die Gruppe der NCRs (eng. Natural Cytotoxicity Receptors) eingeteilt. NKp46 und NKp30 werden auf aktivierten NK-Zellen exprimiert und sind strikt auf NK-Zellen beschränkt, wohingegen NKp40 auch auf einer Subpopulation von TCR γ / δ ⁺ T-Zellen nachgewiesen wurde [Vitale *et al.*, 1998].

Die NCR-Rezeptoren werden in den meisten Individuen in hoher Dichte exprimiert. Dabei korreliert die Dichte ihrer Expression auf der Zelloberfläche mit der Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber ihren Zielzellen [Ishigami *et al.*, 2000]. Es konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Zytotoxizität von NK-Zellen in HIV Patienten mit einer geringeren Oberflächendichte der drei NCR-Rezeptoren einherging [De Maria *et al.*,

2003]. Auch scheint es bei myeloischen Leukämien zu einer Modulation der NCR-Rezeptoren auf den NK-Zellen bzw. der noch unbekannten Liganden auf den Leukämiezellen zu kommen [Costello *et al.*, 2002]. Experimente mit NCR-blockierenden monoklonalen Antikörpern belegten, dass die Aktivierung der NK-Zellen über mehrere NCR eine Verstärkung der lytischen Aktivität bewirkt [Vitale *et al.*, 1998; Pende *et al.*, 1999]. Jedoch scheint es Ausnahmen zu geben, da bei einigen Tumorzellen die Lyse selektiv über einen bestimmten NCR-Rezeptor vermittelt wird.

NKp46 scheint einer der wichtigsten aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen zu sein. Hierbei handelt es sich um einen evolutionär konservierten Rezeptor, der bisher neben Primaten auch in der Maus, Ratte und Rind identifiziert werden konnte [Falco *et al.*, 1999; Storset *et al.*, 2004]. In Mäusen wurde NCR1, der zum NKp46 homologe Rezeptor, identifiziert [Bianconi *et al.*, 1999]. Das murine Homolog zum NKp30 Rezeptor ist in den meisten Mäusestämmen ein Pseudogen und wird nur in der Reisfeldmaus (*Mus caroli*) exprimiert [Hollyoake *et al.*, 2005].

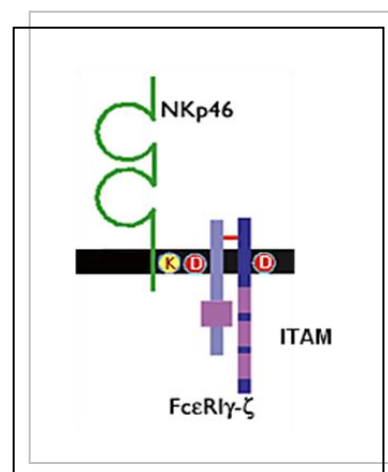


Abb. 5: Der NKp46 Rezeptor

NKp46 wird von allen NK-Zellen, unabhängig vom Stadium ihrer Aktivierung exprimiert. Strukturell besteht der Rezeptor aus zwei C2-Typ-Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Sein zyttoplasmatischer Anteil ist mit FcεR1γ und CD3ζ Adapterproteinen verbunden, die ein bzw. drei ITAM-Motive tragen. CD3ζ und FcεR1γ, die untereinander sowohl Heterodimere als auch Homodimere bilden, werden von Src Tyrosin-Kinasen phosphoryliert und vermitteln ihr Signal mithilfe von Syk und ZAP70 Tyrosin-Kinasen weiter.

Modifiziert nach Lanier, 2001

NKp46 besitzt zwei extrazelluläre Ig-Domänen (s. Abb. 5), eine kurze zyttoplasmatische Domäne ohne ITAM und eine geladene Aminosäure in der Transmembrandomäne [Bianconi *et al.*, 1999]. Bei Aktivierung wird der Rezeptor mit den Adaptermolekülen CD3ζ und FcεR1γ assoziiert, welche ITAM Motive besitzen und durch Phosphorylierung die aktivierenden Signale weiterleiten [Vitale *et al.*, 1998]. Die Rezeptor-Liganden-

Interaktion führt zu einer Mobilisierung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen, zur Zytokinfreisetzung und Zytotoxizität [Sivori *et al.*, 1997; Vitale *et al.*, 1998; Pende *et al.*, 1999].

Der Rezeptor ist an der NK-Zellyse von zahlreichen humanen Tumorzelllinien aus verschiedenen Geweben, aber auch von infizierten Zellen, involviert. Weiterhin kann die natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber einer Reihe von Tumorzelllinien durch Maskierung von NKp46 mit einem Antikörper blockiert werden [Pessino *et al.*, 1998]. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Anfälligkeit einiger Patienten gegenüber Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* mit einer verringerten NKp46 Expression einhergeht [Vankayalapati *et al.*, 2002]. Ferner wurde in experimentellen Studien an Mäusen nachgewiesen, dass NKp46 auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Typ1 Diabetes spielt [Gur *et al.*, 2010]. Zelluläre Liganden der NCRs konnten bisher nicht identifiziert werden. Es wird vermutet, dass es sich um evolutionär sehr konservierte Oberflächenstrukturen handeln könnte, da auch verschiedene murine Zelllinien NKp46 abhängig durch humane NK-Zellen lysiert werden [Pessino *et al.*, 1998]. Bis heute konnte nur eindeutig das virale Hemagglutinin, welches in zahlreichen Virusfamilien exprimiert wird, in Infektionsstudien als funktionelle Bindungsstelle für NKp46 nachgewiesen werden [Mandelboim *et al.*, 2001].

1.4 DIE ROLLE VON NK-ZELLEN IN DER TRANSPLANTATABSTOßUNG

Während schon früh das Interesse der Rolle von NK-Zellen in hämatopoetischen Transplantationen geweckt wurde, konnte erst in den letzten Jahren belegt werden, dass sie aktiv an akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen nach solider Organtransplantation (SOT) beteiligt sind. NK-Zellen können bei allogener Transplantatabstoßung entweder direkt das Organ schädigen oder die adaptive Immunantwort indirekt beeinflussen [Baldwin *et al.*, 2001].

a) Knochenmarktransplantation

Im murinen System wurde bei der Stammzelltransplantation ein NK-Zell-vermitteltes Phänomen, die „F1-Hybridresistenz“ [Cudkovicz und Rossi, 1972], beschrieben. So wurde gezeigt, dass in heterozygoten Rezipienten der ersten Generation (F1) parentales homozygotes Knochenmark abgestoßen wird [Yokoyama, 1995]. Eine Erklärung für dieses Phänomen lieferte die „missing-self“ Hypothese [Ljunggren und Kärre, 1990], denn nur die Expression des vollständigen eigenen MHC-Musters

gewährleistet eine ausreichende Inhibition der NK-Zellen. Das Knochenmark eines Elternteils exprimiert aber nur einen Teil des bekannten MHC, wodurch keine hinreichende Hemmung der NK-Zellen über ihre MHC-I-spezifischen Rezeptoren vermittelt und damit eine Abstoßung des Transplantats provoziert wird. Diese NK-Zell Eigenschaft lässt sich u.a. durch die Anwesenheit der Ly49 bzw. KIR Rezeptoren erklären, welche aktivierend oder inhibierend die zytolytische Aktivität und die Zytokinsekretion der NK-Zellen regulieren können. In weiteren tierexperimentellen Modellen konnte eine Abstoßung von β_2m -defizienten (keine Zelloberflächenexpression des MHC-I-Komplex), aber genetisch MHC-identischen Transplantaten beobachtet werden [Liao *et al.*, 1991; Bix *et al.*, 1991]. In klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass NK-Zellen, welche als erste nachweisbare Lymphozytenpopulation rekonstituiert werden, in erhöhter Konzentration nachweisbar sind als in der gesunden Kontrolle [Atkinson *et al.*, 1990; Niederwieser *et al.*, 1987]. Im Zusammenhang mit Knochenmarktransplantationen wurde beim Menschen außerdem postuliert, dass die Abstoßung allogener Zellen von nicht immunsuppressiv vorbehandelten Patienten mit schweren kombinierten Immundefizienzen (SCID) ebenfalls durch NK-Zellaktivität zu erklären ist [O'Reilly *et al.*, 1986].

b) Solide Organtransplantation

In klinischen und experimentellen Studien wurde gezeigt, dass NK-Zellen direkt nach Nieren- und Herztransplantationen in das Transplantat infiltrieren [Nemländer *et al.*, 1983; Heidecke *et al.*, 1985; Petersson *et al.*, 1997]. Die Beobachtung, dass die Infiltration der NK-Zellen bereits vor der Rekrutierung von T-Zellen einsetzt, lässt sich gut mit ihrer Rolle als frühe Effektoren des angeborenen Immunsystems vereinbaren [Baldwin *et al.*, 2001]. Es besteht die Annahme, dass durch die Abwesenheit der selbst MHC-Klasse-I-Moleküle auf dem Allotransplantat, welche die NK-Zellaktivierung negativ kontrollieren könnten, eine Hyperaktivierung während der frühen post Transplantationsphase der NK-Zellen ausgelöst wird, die direkt die Abstoßung des Organs vermittelt. Alternativ könnte eine NK-Zellaktivität als indirekte Auswirkung auf den Abstoßungsprozess zu einer T-Zellaktivierung und somit einer Erhöhung der Inflammation führen.

Ein direkter Beleg, dass allogene NK-Zellen nach solider Organtransplantation das Transplantatüberleben beeinflussen, konnte erstmals im experimentellen Herztransplantationsmodell durch Maier *et al.* erbracht werden. So zeigt die Arbeit, dass allogene H-2^d BALB/c Herzen durch H-2^b (C57BL/6) CD28-defiziente (Blockierung des T-Zell kostimulatorischen Signals) im Vergleich zu Wildtyp-Empfängern nur gering verzögert abgestoßen werden, wohingegen semiallogene H-2^{bxd} Transplantate in CD28^{-/-} Mäusen dauerhaft überlebten. Weiterhin führte die Depletion von NK1.1⁺

Zellen zu einem deutlich verlängerten Überleben von allogenen Herzen in CD28-defizienten Empfängern [Maier *et al.*, 2001]. Durch weiterführende Forschung konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere NK- und nicht NKT-Zellen an der akuten Abstoßung von kardialen H-2^d (BALB/c) Transplantaten in CD28^{-/-} Mäusen beteiligt sind. Eine kleine Subpopulation von NK-Lymphozyten, welche negativ für H-2^d bindende inhibierende Ly49 Rezeptoren sind, waren ausreichend, um eine Abstoßungsreaktion zu initiieren [McNerney *et al.*, 2006]. Ein weiterer interessanter Ansatz scheint, dass Natürliche Killerzellen direkt an der Entwicklung einer chronischen Abstoßung beteiligt sind [Russell *et al.*, 2001]. Unter der Verwendung eines semi-allogenen Herztransplantationsmodells zwischen parental Spendern und Tieren der F1-Generation als Empfänger konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen wesentlich zu der Entwicklung einer kardialen Vaskulopathie (engl. Cardiac Allograft Vasculopathy, CAV) beitragen [Uehara *et al.*, 2005]. Folglich partizipieren, durch die Abwesenheit von autologen MHC-Molekülen des Donors, aktivierte NK-Zellen an der Pathogenese einer CAV. Diese Daten implizieren, dass NK-Lymphozyten in der Frühphase nach Transplantation eine Kaskade von Effektormechanismen initiieren, die im Langzeitverlauf in der Akkumulation von endothelialen Schädigungen resultiert. Weitere Daten belegen, dass NK-Zellen indirekt zu einer Rejektion beitragen, in dem sie Effektorzellen wie zytotoxische T-Zellen oder Helfer-T-Zellen aktivieren. Diese Erkenntnisse sind besonders von klinischer Bedeutung, da NK-Zellen durch die derzeitigen immunsuppressiven Therapien nicht erreicht werden [Kitchens *et al.*, 2006]. Umfangreiche *in vivo* und *in vitro* Studien zeigten, dass Cyclosporin die Proliferation und zytotoxische Aktivität von alloreaktiven NK-Zellen nicht unterdrücken kann [Vampa *et al.*, 2003; Petersson *et al.*, 1997; Lefkowitz *et al.*, 1988]. Auch durch Tacrolimus [Kageyama *et al.*, 1997; Alamartine *et al.*, 1994], MMF [Shapira *et al.*, 2005] und Azathioprin [Pedersen und Beyer, 1986] konnte in bisherigen Untersuchungen keine hemmende Wirkung auf NK-Zellen hervorgerufen werden.

1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Während die Mechanismen der adaptiven Komponente des Immunsystems als Ausgangspunkt für zahlreiche immunsuppressive Therapien dienen, wurde die Relevanz der angeborenen Immunantwort bisher nur unzureichend untersucht. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass die Depletion von NK-Zellen unter kostimulatorischer Blockade zu einem verlängerten Transplantatüberleben führte [Maier *et al.*, 2001]. Ferner wurden Hinweise gefunden, dass NK-Zellen bei der akuten Abstoßung von Hauttransplantaten die adaptive Immunantwort aktiv beeinflussen [Coudert *et al.*, 2002].

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit ist die Identifikation weiterer Hinweise, ob NK-Zellen bzw. insbesondere der spezifische NK-Zellrezeptor NKp46 (NCR1 in der Maus) die Interaktionen zwischen der natürlichen und adaptiven Immunantwort bei dem Abstoßungsprozess beeinflusst. Als Fernziel sollen unter Berücksichtigung der zellulären Mechanismen während eines Abstoßungsprozesses optimierte Strategien für eine gezielte Immunsuppression entwickelt werden.

Unter Verwendung eines vollständig allogenen murinen Herztransplantationsmodells werden Herzen von Balb/c Mäusen in NCR1^{GFP/GFP} bzw. C57BL/6 Wildtypiere transplantiert. Die NCR1^{GFP/GFP} Maus ist dabei durch eine NCR1-Defizienz und Einfügen des GFP-Gens in den NCR1 Leserahmen charakterisiert.

Folgende spezifische Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- 1) Führt ein NCR1 ko zu einem verlängerten Transplantatüberleben? Welchen Einfluss hat eine zusätzliche Kostimulationsblockade mit CTLA-4-Ig?
- 2) Lassen sich insbesondere infiltrierende NK-Zellen im Transplantat und in der Empfängermilz nachweisen?
- 3) Wie verhält sich die zelluläre Infiltration von NK-, T-, Treg- und Dendritischen Zellen während des zeitlichen Verlaufes der akuten Abstoßung?
- 4) Wie verändert sich die Zusammensetzung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen in den Transplantaten, der Milz und den Lymphknoten bei einer NCR1-Defizienz und unter Kostimulationsblockade?
- 5) Welche Zytokinprofile werden in den NCR1-defizienten Empfängertieren im Vergleich zu den Wildtypmäusen detektiert.
- 6) Welche Unterschiede in der zytotoxischen Aktivität weisen NK-Zellen von NCR1^{+/+} und NCR1^{GFP/GFP} Tieren auf?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Medien und Puffer

Medium oder Puffer	Bezugsquelle bzw. Zusammensetzung
RPMI	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
1x PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
10x HBSS	Gibco BRL, Eggenstein
Erythrozyten Lyse	10mM KHCO ₃ , 155mM NH ₄ Cl, 0,1mM EDTA, in <i>bidest aqua</i>
Komplett „Maus“ Medium	10% FCS , 100 U/ml Penicillin, 100µg Streptomycin, 2mM L-glutamine, 0,05mM β-Mercaptoethanol
FACS Färbe-Puffer	1x Dulbecco's PBS, 1% FCS
MACS-Puffer	1x Dulbecco's PBS, 2mM EDTA, 0,5% FCS
Gefrier- und Einbettmedium	Jung, Leica instruments GmbH, Nussloch (Deutschland)

2.1.2 Kits

Kits	Bezugsquelle
Absolutely RNA Miniprep Kit	Stratagene, La Jolla (USA)
NK-Zell Isolations Kit, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
FoxP3 Staining Buffer Set, Human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Basic Kit mouse/rat FlowCytomix	Bender Medsystems GmbH, Wien (Österreich)
Mouse IFNγ FlowCytomix	Bender Medsystems GmbH, Wien (Österreich)
Mouse RANTES FlowCytomix	Bender Medsystems GmbH, Wien (Österreich)
Mini26-1KT, PKH26	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
GranzymeB ELISA Ready-Set-Go! Maus	eBioscience, Inc., San Diego (USA)
IL-15 ELISA Ready-Set-Go! Maus	eBioscience, Inc., San Diego (USA)

2.1.3 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
DNA Thermozykler	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD, San Jose (USA)

Inkubator	Heraeus, Hanau (Deutschland)
NanoDrop ND 1000	Peqlab, Erlangen (Deutschland)
Plattenleser	Tecan Group, Männedorf (Schweiz)
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt (Deutschland)
Kryotom Microm HM 560	Microm International GmbH, Walldorf (Deutschland)
Inhalationsnarkosegerät	Vapor, Dräger AG, Lübeck (Deutschland)
Operationsmikroskop SZX7	Olympus GmbH, Hamburg (Deutschland)
Konfokalmikroskop TCS SL	Leica, Heidelberg (Deutschland)

2.1.4 Software

Software	Bezugsquelle
7500 System Sequence Detection SW 1.3	Applied Biosystems, Weiterstadt (Deutschland)
BD CellQuest Pro Software	BD, San Jose (USA)
FlowJo	TreeStar, Inc., San Carlos (USA)
GraphPad Prism	GraphPad software Inc., La Jolla (USA)
Software Fluoreszenzmikroskop	Leica Confocal Software, Heidelberg (Deutschland)

2.2 VERSUCHSTIERE

2.2.1 Tierspezies und Tierhaltung

Alle Versuche wurden an ingezüchteten männlichen Mäusen im Alter von 8 bis 12 Wochen und einem Gewicht von 22 bis 30g durchgeführt. Als Transplantatempfänger dienten C57BL/6 (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld) bzw. NCR1^{GFP/GFP} Mäuse (freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Ofer Mandelboim) mit dem Haplotyp H-2^b. Als syngene Kontrollen wurden Spenderherzen desselben Stammes verwendet. Als allogene Donoren fungierten BALB/c Mäuse (Charles River) mit dem Haplotyp H-2^d, die allogenen zu den Empfängertieren in allen Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigenen sind. Alle Tiere sind in Bezug auf die wichtigsten, in Frage kommenden Infektionskrankheiten untersucht und durch ein Gesundheitszeugnis der Tierlabore als gesund attestiert worden.

Die Haltung der Tiere erfolgte artgerecht mit einem 12-stündigen Licht-/Dunkelrhythmus im Forschungshaus der Charité, Campus Virchow, Berlin. Die Mäuse wurden in Macrolonkäfigen (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) auf Einstreu bei Pressfutter (Ssniff) und Wasser *ad libitum* gehalten.

2.2.2 Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche waren gemäß Tierschutzgesetz von der zuständigen Behörde in Berlin, dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LaGetSi) unter dem Aktenzeichen G0202/07 zuvor genehmigt worden. Alle tierexperimentellen Versuche wurden nur von entsprechend autorisierten Personen durchgeführt.

2.3 TIERMODELL

2.3.1 Die $NCR1^{GFP/GFP}$ Maus

Die $NCR1^{GFP/GFP}$ Maus (C57BL/6 Hintergrund) wurde von Prof. Ofer Mandelboim generiert und uns freundlicherweise für die eigene Zucht zur Verfügung gestellt.

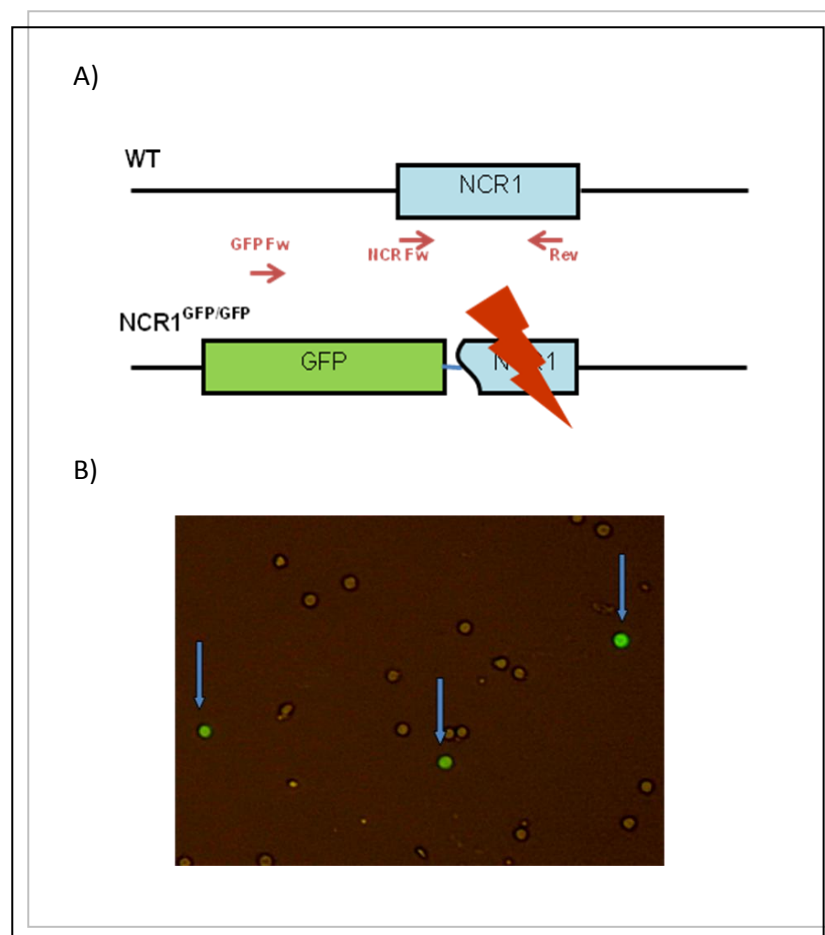


Abb. 6: $NCR1^{GFP/GFP}$ Maus

Bei der transgenen $NCR1$ Knockout Maus wurde ein GFP Gen in die kodierenden Sequenzen des $NCR1$ Gens eingefügt. Das GFP Gen steht somit unter der Kontrolle der regulierenden Elemente des $NCR1$ Gens und beeinträchtigt die Funktionsfähigkeit des $NCR1$ Gens (A). Das GFP-Signal ermöglicht eine Identifikation von NK-Zellen aus ex vivo isolierten Splenozyten mittels Überlagerung von Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie (B).

Die NCR1^{GFP/GFP} Maus ist durch das Einfügen der GFP-Genkassette charakterisiert, welche die Funktion des NCR1 Gens beeinträchtigt, jedoch unter Kontrolle dessen regulatorischer Elemente steht (s. Abb. 6). Durch die genetische Modifikation werden die NK-Zellen nicht depletiert. Vielmehr ist durch die Einführung des Reportergens eine einfache Detektierung und Visualisierung der NK-Zellen in verschiedenen Geweben und in *in vitro* Kulturen möglich.

2.3.2 MHC-mismatch bei gewählter Stammkombination

In den Experimenten dieser Studie wurde ein kompletter MHC-mismatch verwendet, da die Spendermäuse C57BL/6 H-2-K^b, -L^b und -D^b als MHC-Klasse-I sowie I-A^b und I-E^b als MHC-Klasse-II-Moleküle besitzen (s. Abb. 7). Die Balb/c Empfängermause besitzen hingegen in beiden Klassen das d-Allel an der Stelle des b-Allels. H-2L^b und I-E^b kommen auf Grund eines Defekts der α -Kette dieser beiden MHC-Moleküle in der C57BL/6 Maus nicht vor. Mit der Auswahl dieser genetischen Spender-Empfänger-Kombination wird eine starke Alloimmunreaktion provoziert.

	Class Ia		Class II			Class III	H2 Loci/Regions		Class Ib		
	K	Ab	Aa	Eb	Ea		D	L	Qa-2	Tb	Qa-1
C57BL/6 (H-2 ^b)	b	b	b	b	^	b	b	b ⁺	a	b	b
Balb/c (H-2 ^d)	d	d	d	d	d	d	d	d	a [@]	c	b

Abb. 7: C57BL/6 und Balb/c Mäuse unterscheiden sich in ihrem MHC Haplotyp

Die in dieser Studie verwendeten Mausstämme C57BL/6 und Balb/c unterscheiden sich in ihrem Haplotypen. C57BL/6 Mäuse tragen den H-2^b MHC-Haplotyp in sämtlichen MHC Genen. Balb/c Tiere besitzen hingegen den Haplotyp d in ihren MHC Loci.

2.4 ABDOMINAL HETERO TOPE HERZTRANSPLANTATION

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden Fragestellungen wurden in einem allogenen, heterotopen Herztransplantationsmodell in der Wildtyp bzw. NCR1-defizienten Maus bearbeitet (s. Abb. 8). Dabei wurden die Spenderherzen heterotop an die großen abdominalen Gefäße des Empfängers anastomosiert. Es handelt sich dabei um ein rein immunologisches Modell, da die Empfängermaus ihr eigenes Herz behält und somit nicht auf die Funktion des Transplantates angewiesen ist. Auch bei einer eventuell ablaufenden Abstoßungsreaktion gegen das Spenderorgan ist das Versuchstier in seinem Wohlbefinden unbeeinträchtigt.

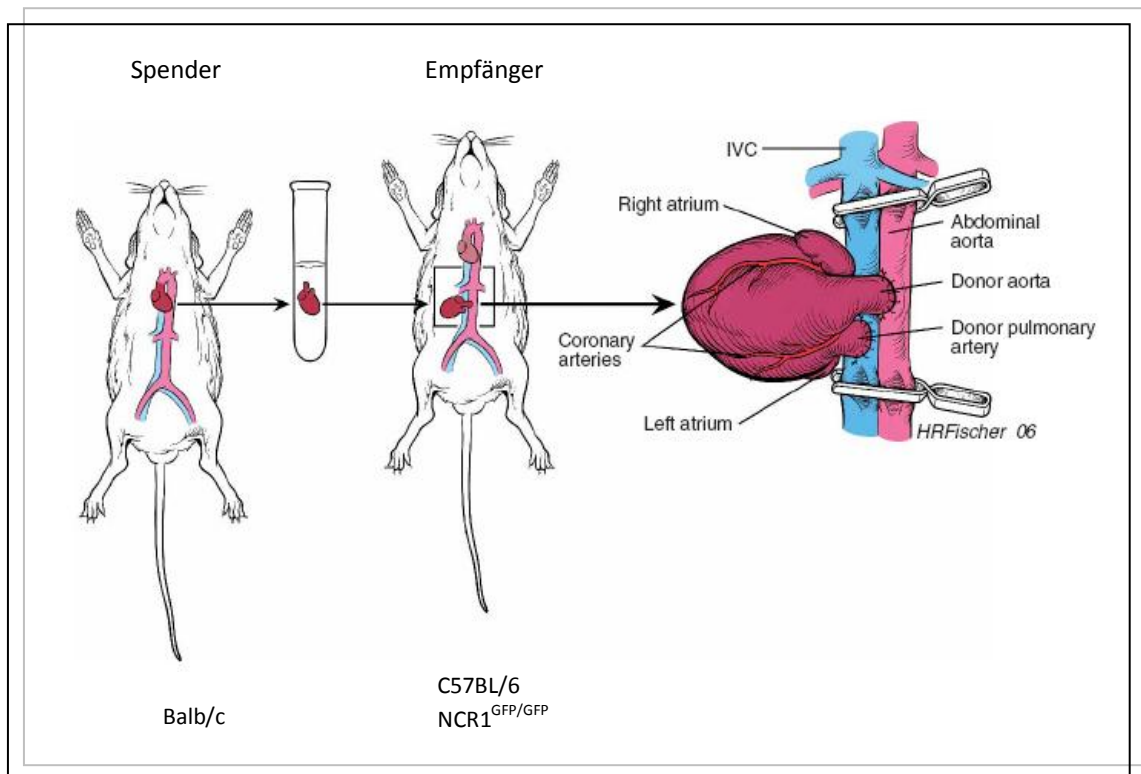


Abb. 8: Abdominal heterotope Herztransplantation

Bei der abdominal heterotopen Herztransplantation an Mäusen wird die Aorta und die Arteria pulmonalis des Spendertiers mittels End-zu-Seit-Anastomosen an die abdominalen Gefäße des Empfängertiers transplantiert.

Modifiziert nach Hasegawa, 2007

2.4.1 Anästhesie

Sämtliche operativen Eingriffe erfolgten unter Inhalationsnarkose. Die Tiere wurden dabei in einer mit Isofluran (Isofluran Baxter, Baxter Caribe Inc., Guayana Puerto Rico 00784) angereicherten Kammer anästhesiert und erst nach Eintritt der Narkose aus dem Gefäß entnommen. Während der Operation bekamen die Mäuse die Erhaltungsdosis über eine speziell für sie angefertigte Inhalationsmaske. Die Zusammensetzung der Narkose bestand aus einem Gasgemisch aus ca. 1 – 1,5Vol% Isofluran mit ca. 0,6l/min Sauerstoff und ca. 0,4l/min Lachgas. Die genaue Menge von O₂ und N₂O wurde anhand des Durchflussströmungsgerätes (Dräger AG, Lübeck) und der Anteil von Isofluran anhand eines Verdunstlers (Vapor, Dräger AG, Lübeck) reguliert (s. Abb. 10 A). Um die Augen der Tiere vor dem Austrocknen zu schützen, wurden sie mit Bepanthen Augensalbe (La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) eingerieben.

2.4.2 Operationsinstrumentarium

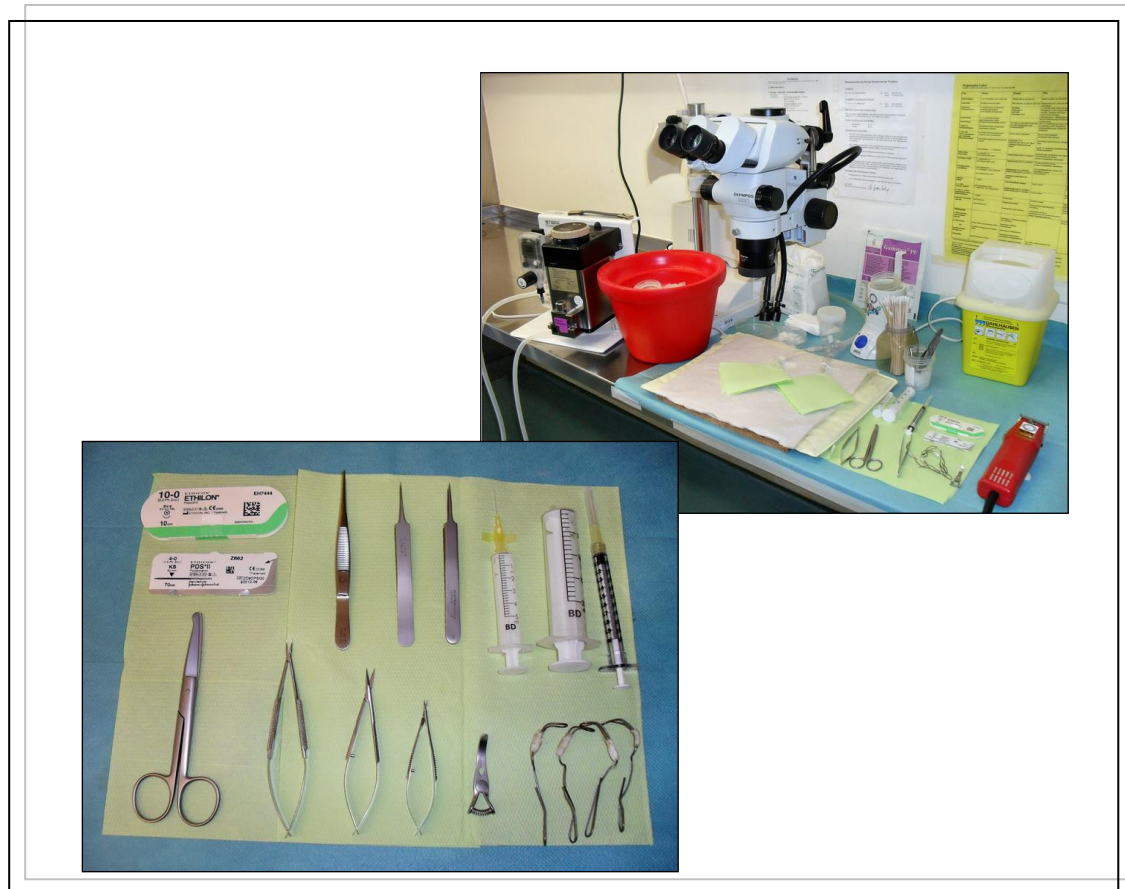


Abb. 9: Mikrochirurgischer Arbeitsplatz und Instrumentarium

- Operationsmikroskop mit bis zu zehnfacher Vergrößerung (SZX7, Olympus, Deutschland)
- Mikrochirurgisches Besteck:
 - Nadelhalter, Knüpfpinzette, Uhrmacherpinzette, chirurgische Pinzette, 2 Federschere, Mikroschere, Bulldogklemme, Klemmen zum Offenhalten des Bauchraumes
- Mikrochirurgischer, bipolarer Gefäßkauter (Bipolar Kauter, Fa. Fischer Medizintechnik/ Freiburg, Deutschland)
- 7/0 Seide (Perma-Hand Seide, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- 10/0 monofiler Faden (Ethilon schwarz monofil 10/0, BV75-4, Bestell-Nr. EH 7444, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- 4/0 Ethilon Faden (PDS II, Bestell-Nr. Z662, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- 0,9% NaCl-Lösung
- Handelsübliche Heizmatte
- Lösung zur Hautdesinfektion (Cutasept® F, Hautdesinfiziens farblos, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland)
- Schermaschine

2.4.3 Mikrochirurgisches Vorgehen

2.4.3.1 Spenderoperation und Entnahme des Transplantates

Die Anästhesie der Spendermaus erfolgte wie unter 2.4.1 beschrieben. Nach der Rasur im OP-Gebiet wurde die Maus mit Pflasterstreifen in Rückenlage auf einer Heizmatte fixiert und desinfiziert. Nach Erlöschen der Schmerzreaktion erfolgte eine mediane Laparotomie vom Sternum bis nahe der Symphyse. Die *Aorta abdominalis* wurde aufgesucht, durchtrennt und die Maus entblutet. Es folgte die Thorakotomie durch Schnitte in beiden Axillarlinien und das Diaphragma wurde scharf vom Rippenbogen abgesetzt. Der Brustkorb konnte nun nach oben geklappt und fixiert werden, die Sicht auf Herz und Lunge war somit frei. Nach vorsichtigem Abpräparieren von Thymus und Fettgewebe wurden die *Aorta ascendens* und die Pulmonalarterien freipräpariert. Nachdem die obere und untere Hohlvene kurz vor ihrer Mündung in den rechten Vorhof, sowie die Venae pulmonales knapp vor ihrem Eintritt in das linke Atrium mit 4/0-Seidenfäden ligiert und durchtrennt wurden, erfolgte die Durchtrennung der *Aorta ascendens* und der *Arteria pulmonalis* weit distal, wobei auf gerade Schnittränder geachtet wurde. Anschließend wurde das Herz über diese Gefäßstümpfe mit eiskalter heparinhaltiger physiologischer Kochsalzlösung gespült. In einer Massenligatur wurden nun die Pulmonalvenen auf der Rückseite des Herzens ligiert und das Transplantat bis zur Implantation in eiskalter 0,9% NaCl Lösung aufbewahrt (Kaltischämie).

2.4.3.2 Transplantation im Empfängertier

Anästhesie, Fixierung und mediale Laparotomie erfolgten wie bei der Spenderoperation. Der Darm wurde nach oben aus dem Abdomen ausgelagert und für die Dauer der Operation in eine mit warmen 0,9% NaCl getränkten Kompresse eingeschlagen und während der gesamten OP feucht gehalten. Das Retroperitoneum wurde stumpf – unter Zuhilfenahme zweier Wattestäbchen – eröffnet. Die großen abdominalen Gefäße wurden sorgfältig vom Abgang der Nierengefäße bis zur Aortenbifurkation freipräpariert (s. Abb. 10 B), wobei die paraaortalen Lymphgefäße und nach dorsal abgehenden Lumbalgefäße elektrisch koaguliert wurden.

Die *Aorta* und *Vena cava abdominalis* wurden nun distal der Nierengefäße und proximal der Aortenbifurkation mit einer Bulldogklemme abgeklemmt. Die *Aorta* wurde mit einer G30 Kanüle punktiert und in Längsrichtung mit einer Federschere aufgeschnitten und mit 0,9% NaCl gespült. Durch je einen Eckstich am proximalen und distalen Ende der Inzision in die *Aorta* wurde der Truncus aorticus des Spenderorgans End-zu-Seit an der *Aorta* des Empfängers fixiert (s. Abb. 10 C). Anschließend wurde die Anastomose fortlaufend mit 4 – 5 Stichen mit 10/0 Ethilon Faden genäht. In gleicher Weise erfolgte die Anastomose des *Truncus pulmonalis* des Spenderherzens mit der *Vena cava abdominalis*. Zur Unterstützung der natürlichen Blutgerinnung wurde nach

Beenden der Anastomosen ein wenig Gelita Tamponade um die Gefäße platziert (s. Abb. 10 D). Nach Entfernen der Klemmen und Reperfusion begann das Spenderherz rasch zu schlagen. Eine rosige Färbung und schnelles Einsetzen der Kontraktionen im Sinusrhythmus belegten eine gelungene Transplantation (s. Abb. 10 E und F). Nach der Rückverlegung des Darmes erfolgte für die Flüssigkeitssubstitution und die Schmerzprophylaxe die intraperitoneale Applikation von 1 – 2ml mit Flunixin-angereicherter isotoner Kochsalzlösung, und das Abdomen wurde zweischichtig, fortlaufend mit 4/0 Ethilon Faden verschlossen. Die Maus erwachte wenige Minuten nach Ausschalten des Isoflurangerätes aus der Narkose und wurde postoperativ mit einer Wärmelampe bestrahlt.

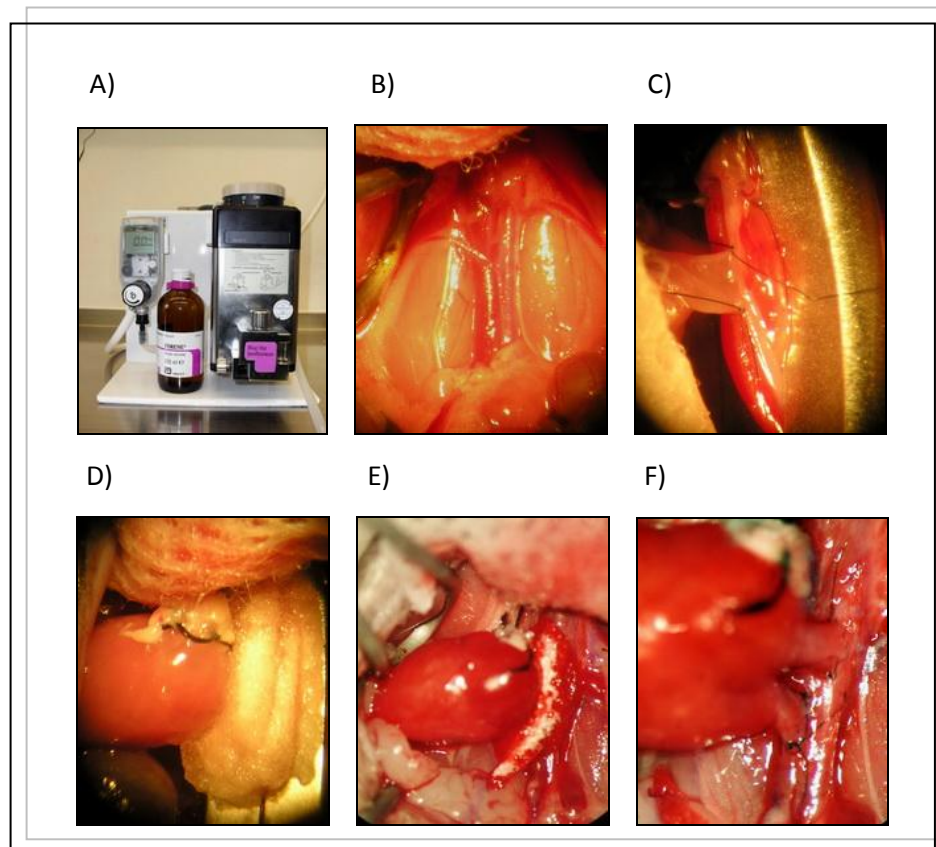


Abb. 10: Photos von der Transplantation

- (A) Die Transplantation erfolgte unter Inhalationsnarkose mit Isofluran. Das Durchflussströmungsgerät und der Verdampfer ermöglichten eine genaue und modifizierbare Dosierung der Narkose während der gesamten Operation.
- (B) Die freipräparierten abdominalen Gefäße des Empfängertiers
- (C) Die Donoraorta wird mit zwei Eckstichen an der abdominalen Aorta des Empfängers fixiert, bevor das Gefäß mit durchgängiger Naht an die Rezipientenaorta anastomosiert wird.
- (D) Gelita Tamponade unterstützt die Gerinnung des Blutes
- (E) Nach Entfernung der Bulldogklemme reperfundiert das Herz innerhalb weniger Sekunden
- (F) Kurze Zeit nach der Reperfusion fängt das Spenderherz an zu schlagen

2.4.4 Transplantatfunktion

Die Vitalität des transplantierten Herzens wurde täglich durch Palpation mit dem Zeigefinger und Daumen im Flankenbereich des Tieres überprüft. Die Einteilung der Schlagkraft des Herzens erfolgte von i) A = kräftiges Schlagen, ii) B = abnehmende Intensität des Herzschlags und iii) C = komplettes Einstellen des kardialen Rhythmus. Als Zeitpunkt der Abstoßung wurde der Tag angegeben, an dem keine myokardiale Kontraktion mehr zu tasten war.

2.4.5 Transplantatentnahme

Zu definierten Zeitpunkten nach der Transplantation (Tag 3, Tag 5 und nach Abstoßung) wurden das Transplantat, die Lymphknoten, das Blut und die Milzen der Empfängertiere entnommen. Anästhesie, mediale Laparotomie und Auslagerung des Darms erfolgten wie oben beschrieben. Es folgte die Thorakotomie und die thorakale *Vena cava inferior* wurde scharf durchtrennt und die Maus so entblutet. Nach Absaugen des Blutes mit einer 1ml Tuberkulinspritze wurde das Transplantat scharf entlang der Anastomosen aus dem Abdomen entfernt und mit heparinhaltiger Kochsalzlösung perfundiert. Die Vorhöfe der geernteten Herzen wurden verworfen und jeweils ein Teilstück der Transplantate, Milzen und Lymphknoten direkt in flüssigem Stickstoff für spätere RNA-Isolierung schockgefroren. Für anschließende FACS-Analysen wurden die Organe in eiskaltem HBSS-Puffer bzw. Komplett-Medium (s. Kapitel 2.1) zwischengelagert. Folgenden immunhistologische Analysen wurden die Organe fixiert und in Gefriermedium eingebettet (s. Kapitel 2.1)

2.5 MOLEKULARBIOLOGIE

Nach dem Ernten der Organe wurden ca. 4mm² große Stücke der Herzspitze, der Milz und Teile der Lymphknoten einzeln in einem Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.5.1 Arbeiten mit RNA

2.5.1.1 RNA-Isolation

Die RNA-Präparation wurde mit dem „Absolutely RNA Microprep Kit“ der Firma Stratagene nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieses System basiert darauf, dass Silica-Partikel, wie z.B. salinisierte Glaswolle, unter Hochsalzbedingungen RNA bindet [Vogelstein und Gillespie, 1979]. Das Kit beinhaltet mit Silica-Material befüllte Zentrifugenröhrchen, einen Lysispuffer, der als chaotropes Salz Guanidinisothiocyanat

enthält, Waschpuffer mit hoher und niedriger Salzkonzentration und einen Elutionspuffer.

Die verwendeten Organproben wurden mit je 3 Metallkugeln (Tungsten Carbide Beads, 3mm, Qiagen) im Mixermill aufgeschlossen (3min, bei Frequenz = 30/sec) und mit Lysispuffer unter denaturierenden Bedingungen (Guanidinisothiocyanat) lysiert, um vorhandene RNAsen zu inaktivieren [Chirgwin *et al.*, 1979]. Zusätzlich wurde β -Mercaptoethanol (0,1M) dem Lysispuffer zugesetzt, welches die Disulfidbindungen der Tertiärstruktur von RNAsen reduziert. Das Homogenisat wurde über einen Prefilter gegeben, damit Gewebestücke (z.B. Herzmuskeln usw.) entfernt wurden. Die RNA wurde nun mit Ethanol gefällt und durch Zentrifugation an die Silica-Faser-Matrix gebunden. Verunreinigungen mit genomischer DNA wurden durch die DNase-Behandlung entfernt. Die RNA wurde anschließend zum Aufreinigen mit Hoch- und Niedrigsalzpuffer gewaschen und danach in Elutionspuffer eluiert. Die isolierte RNA wurde, wenn sie nicht sofort weiterverwendet wurde, bei -80°C gelagert.

2.5.1.2 RNA-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometers (Nanodrop Technologies). Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm. Liegt RNA vor, so entspricht eine OD_{260} von 1,0 einer Konzentration von $40\mu\text{g/ml}$. Proteine hingegen besitzen ihren Absorptionspeak bei 280nm. Die Reinheit der Nukleinsäure wurde über den Quotienten von 260nm zu 280nm Wert bestimmt, wobei der Quotient bei reinen RNA-Lösungen einen Wert von mehr als 1,8 erreichen sollte.

Beim NanoDrop Photometer können Konzentrationen von 2 – $3000\text{ng}/\mu\text{l}$ in einem Probenvolumen von nur $1\mu\text{l}$ gemessen werden. Die isolierte RNA wurde dazu direkt auf die Messoberfläche pipettiert und der Schwingarm des Gerätes darauf heruntergelassen. Durch die Oberflächenspannung der Probe wurde eine Flüssigkeitssäule zwischen den Enden der optischen Fasern der Messoberfläche und des Schwingarms aufgebaut, die den Messpfad etablierte. Die gemessenen Spektren, Absorptionswerte und Konzentrationen wurden anschließend von der mitgelieferten Software dargestellt.

2.5.2 Reverse Transkription

Die Abkürzung cDNA steht für complementary DNA und ist das Ergebnis der Behandlung von RNA mit dem Enzym Reverse Transkriptase in Gegenwart von NTPs. Es wurde eine Reverse Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus (M-MLV-RT) verwendet, welche nur eine geringe RNase-H Aktivität besitzt, womit längere

cDNA-Transkripte synthetisiert werden können. Die M-MLV-RT hat ein Temperaturoptimum bei 37°C. Da bei dieser Temperatur Sekundärstrukturen der mRNA schlecht gelöst werden, wurde die Temperatur auf 42°C erhöht, ohne dass eine Aktivitätseinbuße merklich war. Zusätzlich wurde zur Auflösung der Sekundärstrukturen eine Vorinkubation für zehn Minuten bei 75°C durchgeführt. Als Primer wurden für die Reverse Transkription Oligo-dT-Primer aus 16 – 20 Thymidinen eingesetzt, die an das Poly-A⁺-Ende von mRNAs binden. Da bei keiner RNA-Präparation eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen ist, wurde vor der cDNA-Synthese ein zusätzlicher DNase Verdau durchgeführt.

Die Ansätze (18µl, mit 2µg RNA) wurden für zehn Minuten bei 75°C inkubiert und abgekühlt, der Mixansatz hinzugefügt und eine DNase Behandlung für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt.

Mixansatz je Probe	Menge
Reaktionspuffer	8,0µl
dNTP (2,5mM)	4,0µl
aqua dest	4,0µl
DNase (2u/µl)	2,0µl
RNase-Inhibitor (40u/µl)	0,5µl

Nach einer fünf minütigen DNase-Deaktivierung bei 75°C wurden die Proben abgekühlt, die Reverse Transkriptase und der RNase-Inhibitor hinzugefügt, dann für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Ansätze für fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Wurden die cDNAs nicht sofort für die RT-PCR weiterverwendet, wurden sie bei -20°C zwischengelagert.

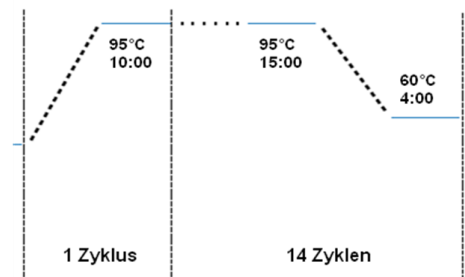
2.5.3 Präamplifikation

Präamplifikationstechniken (PreAmp) erhöhen die Sensitivität der real-time RT-PCR speziell für gering vorkommende Gene und können substantiell höhere cDNA Mengen hervorbringen, die es erlauben die Anzahl zu analysierender Gene zu erweitern. Sowohl die Aufrechterhaltung von Expressionsprofilen als auch eine breite Anwendbarkeit auf viele Zielgene ist ein weiterer faszinierender Aspekt des PreAmp-Verfahrens.

Jeweils 9µl von den 10µM vorverdünnten Lösungen der Forward- und Reverseprimer der selbst designten Genexpressionsassays bzw. der von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) inventarisierten Taqman Genexpressionsassays wurden in

einen Primer-Pool vereinigt und mit Wasser auf 500µl aufgefüllt. Folgender PreAmp Ansatz wurde pipettiert und die Amplifikation erfolgte nach Herstellerangaben:

PreAmp Ansatz	Menge
PreAmp MasterMix (2x)	6,25µl
aqua dest	8,0µl
Pooled PrimerMix	6,25µ
PCR Puffer (mit MgCl ₂)	2,5 µl
	23 µl
	+ 2,0µl cDNA



Die cDNA wurde anschließend 1:20 verdünnt und in die real-time RT-PCR eingesetzt.

2.5.4 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Im Vergleich zur Endpunkt-PCR, bei der DNA-Produkte qualitativ nachgewiesen werden können, ermöglicht die quantitative PCR-Methode die Visualisierung der Amplifikation der Proben in Echtzeit. Bei der Real-Time PCR wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff verwendet, um die Reaktion verfolgen zu können, da die Fluoreszenz proportional mit der Produktmenge ansteigt. Die Signale können über eine exponentielle Kurve verfolgt werden. Aus dieser exponentiellen Probenanalyse wird der sogenannte C_T-Wert („Theshold Cycle“) ermittelt, der die Zyklenzahl angibt, bei der zum ersten Mal ein statistisch signifikantes Reportersignal über dem Grundrauschen detektiert wird. Die Fluorophore werden, je nach System, mit Halogen-, LED- oder Laserlicht angeregt. Die Quantifizierung erfolgt mittels einer geeigneten Computersoftware.

2.5.4.1 TaqMan-Assay

Beim TaqMan- oder auch 5'-Nuclease-Assay liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonucleotid-Primern ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Oligonucleotid, die sogenannte TaqMan-Probe, die zur Erhöhung der Spezifität beiträgt.

TaqMan-Proben sind Sonden, die am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (FAM; Emission bei 518nm) markiert sind und am 3'-Ende Rhodamin als Quencher (TAMRA; Emission bei 582nm) tragen, der zusätzlich mit einem Phosphatrest

blockiert ist. Bei Anregung der intakten Sonde wird deren Fluoreszenz durch die räumliche Nähe vom Reporter-Farbstoff zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Während der PCR hybridisieren Sonde und Primer gleichermaßen an den Matrizenstrang. Bei der Neustrangsynthese schneidet das Enzym Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonucleaseaktivität die TaqMan-Sonde in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Loslösung des Reporters vom Quencher kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt werden kann. Die freie, nicht-gebundene Sonde wird nicht hydrolysiert. Die Fluoreszenz des Reporters steigt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes mit jedem PCR-Zyklus an.

2.5.4.2 Relative Quantifizierung

Für Genexpressionsstudien ist es häufig ausreichend, einen Vergleich zweier Gene oder eines Gens nach unterschiedlicher Stimulation anzustellen. Es können später Aussagen darüber getroffen werden, ob und um welchen Faktor die Gene im Vergleich zueinander stärker exprimiert werden. Zur Relativierung lässt man parallel in jedem Lauf ein sogenanntes *Housekeeping*-Gen amplifizieren. Ein *Housekeeping*-Gen ist ein Gen, das unreguliert, konstitutiv exprimiert wird (z.B. HPRT oder β -Actin).

Die relative Quantifizierung der Expressionshöhe erfolgt unter Nutzung des ermittelten C_T -Wertes. Generell gilt, umso höher die Startkopienzahl der Probe ist, desto geringer wird der C_T -Wert. Arbeitet z.B. ein System mit 100 % Effizienz, nimmt der C_T -Wert mit jeder Verdopplung der Startkopienzahl um genau einen Zyklus ab. Das dimensionslose Ergebnis wird ermittelt, indem die Zielsequenz relativ in ihrer Expression zu einem *Housekeeping*-Gen ins Verhältnis gesetzt wird:

$$\Delta C_T = MW C_T (\text{Zielsequenz}) - MW C_T (\text{housekeeping gene})$$

$$\text{Ergebnis} = 2^{-\Delta C_T}$$

Zur Durchführung der PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

Ansatz für Doppelwerte	Menge
TaqMan MasterMix	12,5 μ l
aqua dest	4,5 μ l
PrimerMix	6,0 μ l
Sonde	1,0 μ l
	12 μ l + 1,0 μ l cDNA

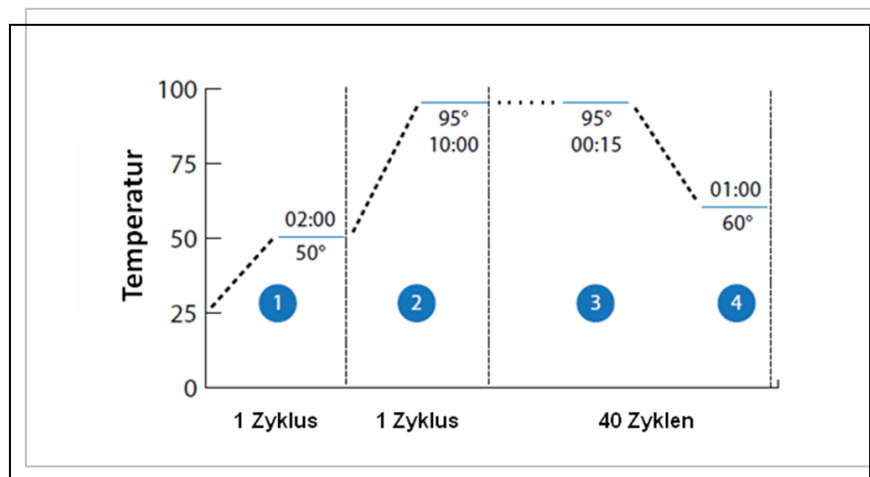


Abb. 11: Das verwendete TaqMan PCR Programm

Der PCR Ansatz wurde zunächst für 2 Minuten auf 50°C erhitzt, um uracilhaltige PCR-Produkte hydrolysieren. Eine Erhöhung der Temperatur auf 95°C erfolgt die Vervielfältigung der cDNA.

Der TaqMan-Mastermix enthält die AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTP's mit dUTP, MgCl₂ (5mM Endkonzentration), ROX (passiver Referenzfarbstoff) und eine Uracil-N-Glycosylase (UNG). Durch die Verwendung von dUTP's statt dTTP's werden eventuelle Kontaminationen mit bereits amplifizierten PCR-Produkten verhindert. Die Zugabe des UNG-Enzyms bewirkt während der 2-minütigen Inkubation bei 50°C die Hydrolyse uracilhaltiger PCR-Produkte (s. Abb. 11). Die anschließende 10-minütige Inkubation dient der Inaktivierung des Enzyms, der Denaturierung der verdauten DNA-Proben und der gleichzeitigen Aktivierung der Polymerase.

Als Housekeeping-Gen diente Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase (HPRT). Es wurde jeweils 1µl cDNA in ein „optical tube“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) vorgelegt und 12µl eines Reaktionsmixes hinzugefügt. Zur Überprüfung einer Kontamination der Mixansätze mit genomischer DNA wurde jeweils ein Doppelansatz ohne cDNA-Template pipettiert. Die Tubes wurden mit „optical caps“ (lichtdurchlässige Kunststoffdeckel, ABI) verschlossen und die PCR wurde in einem „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“ von Applied Biosystems durchgeführt.

2.5.4.3 Generierung eines TaqMan-Panels

Zur Etablierung der TaqMan-Panel wurden die Gen-Sequenzen der Genom-Datenbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information) entnommen. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass die TaqMan-Sonden bestenfalls eine Exon-Exon-Grenze überlappen, um zu gewährleisten, dass die Sonde nicht an genomische DNA binden kann, falls die cDNA mit genomischer DNA kontaminiert ist. Der GC-Gehalt und potentiell auftretende Bildung von Primer-Dimeren wurde über das „OLIGO“-

Programm überprüft. Um eine optimale Konzentration der Primer zu ermitteln, wurde eine Primertitration durchgeführt. Zur Effizienzbestimmung des Panels wurde eine Standardkurve mit SYBR-Green generiert. Der Logarithmus der Verdünnungen wurde gegen die ΔC_T -Werte aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Wenn der Betrag der Steigung unter 0,01 lag, wurden die Effizienz von HPRT und des untersuchten Gens für in etwa gleich angenommen.

Primer		Sequenz
CD3	FW	5' ATT GCG GGA CAG GAT GGA G 3'
	REV	5' CTT GGA GAT GGC TGT ACT GGT CA 3'
	Sonde	5' TCG CCA GTC AAG AGC TTC AGA CAA GCA 3'
Ly49H	FW	5' AGT GTT TCA GAT TCT TCA CGA 3'
	REV	5' CAT CCA CTC CAT GTA GTT TTA 3'
	Sonde	5' ACT GGT TCT GCT ATG GTA CTA AAT GTT 3'
Ly49A	FW	5' GTT CAT TGT GAT AGC TCT TGG C 3'
	REV	5' TTC CTG CAG TTT TTT TTG TTG ATC 3'
	Sonde	5' GTA GCT GTT TCA GTG TTG GCA ATA AAA 3'
Ly49D	FW	5' T GG AGA CAC GGA AGC CTG A 3'
	REV	5' GTC GAA GGG AAA TGA GGA TC 3'
	Sonde	5' TAT CAC AAT GAG CTG CCA GGG AAC 3'
Ly49G	FW	5' GTT GGC AAT AAC GAT TTT TCA GC 3'
	REV	5' CAG TTC ATC CTT C CA AGT TGA C 3'
	Sonde	5' TTA TCG TGG CAG TTT AGA GTT TCC TGT 3'
FoxP3	FW	5' CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT 3'
	REV	5' TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG 3'
	Sonde	5' ATC CTA CCC ACT GCT GGC AAA TGG AGT C 3'

FW: Forward Primer

REV: Reverse Primer

A: Adenin

C: Cytosin

G: Guanin

T: Thymidin

C bzw. **T**: mismatch

2.6 IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN

Diese Methode findet in weiten Bereichen der Biologie Anwendung, um Moleküle in Zellen und Geweben zu lokalisieren. Verschiedene Antigene lassen sich somit in Gewebeschnitten mit unterschiedlich markierten Antikörpern differenziert nachweisen.

Die Experimente wurden nach Einführung durch Dr. Anja Hauser und Katrin Roth im Deutschen Rheuma Forschungszentrum (DRFZ) angefertigt und ein Teil der Materialien uns freundlicherweise bereitgestellt.

2.6.1 Gefrierschnitte

Nach dem Ernten wurden die Herzen und Milzen in zwei Hälften geschnitten und in 1%igem Histofix (4 % Roti®-Histofix, Roth, Karlsruhe) 5 Stunden bei 4°C im Dunklen fixiert. Nach drei Wachschritten mit PBS folgte zur Kryoprotektion eine Inkubation im Zuckergradienten mit 10%, 20% und 30%iger Saccharoselösung, wobei bei jedem Schritt solange gewartet wurde, bis die Organe von alleine zu Boden sanken. Anschließend wurde in Cryomolds Gefriermedium (Jung Tissue freezing medium, Leica instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) gegossen und die mit einem Kimwipe abgetupften Organe in das Medium platziert. Die Cryomolds wurden nun vorsichtig mit einer Pinzette in Isopentan (2-Methylbutan, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) getaucht, welches durch 100%igen Methanol und Trockeneisflocken gekühlt war. Die so erzeugten Gefrierblöcke konnten bis zur weiteren Bearbeitung in Frischhalte- und Alufolie umwickelt bei -80°C aufbewahrt werden.

Die Kryoschnitte wurden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Thermo Scientific, Microm HM 560) im DRFZ angefertigt. Hierzu wurden die gefrorenen Gewebeproben mit dem Eindeckmittel an einer Außenseite dünn benetzt und auf einen Block aufgebracht. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 7µm hergestellt, die auf mit einer permanent positiven Ladung versehen Objektträgern (Fisher Superfrost Plus, Fisher Scientific) angesaugt wurden.

2.6.2 Fluoreszenzfärbung

Die Organschnitte wurden mit einem Pap-Pen umrandet und nach Trocknung des Fettrandes kamen die Objektträger für 20 Minuten in ein 1x PBS Bad. Die weiteren Färbeschritte wurden in einer abgedunkelten, feuchten Kammer durchgeführt. Das 20 minütige Blocken mit 10% Serum erfolgte in dem Waschpuffer (1% BSA, 0.1% Tween-20 in 1x PBS), auf welches die Inkubation mit den Primärantikörpern für 1 Stunde bei Raumtemperatur folgte. Ungebundene Antikörper wurden durch 3 x 10 minütige

Waschschritte in Waschpuffer entfernt. Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls für 1 Stunde bei RT inkubiert und wie oben gewaschen. Die Schnitte wurden nun 2x für 10 Minuten in einem PBS Bad gewaschen und nach leichter Trocknung mit Prolong Gold antifade Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), welches DAPI enthielt, eingedeckelt. Die Präparate wurden bis zur Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Antikörper	Klon	Konzentration	Bemerkung
GFP Alexa Fluor 488		1 : 100	Im DRFZ gekoppelt
CD11c Alexa Fluor 546	N418	1 : 100	Im DRFZ gekoppelt
CD4 Cy5	GK 1.5	1 : 400	Im DRFZ gekoppelt
B220 Alexa Fluor 546	RA3.6B2	1 : 500	Im DRFZ gekoppelt
Actin SM Biotin	1A4	1 : 500	Von Thermo Scientific
CD31 Biotin	390	1 : 30	Von ebioscience
Streptavidin Alexa Fluor 555		1 : 1000	Invitrogen

2.6.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzphotos wurden mit der Leica TCS SL (Spectral Confocal Microscope, Heidelberg) unter einer 10x bzw. 20x Vergrößerung aufgenommen. Für die bessere Qualität der Bilder wurden die Schnitte in Z-Stapeln mit ca. 6 – 10 Schichten aufgenommen und jeweils unter Verwendung der Leica Confocal Software überlagert. Anschließend wurden die Bilder mittels Adobe Photoshop und Adobe Illustrator für eine stärkere Farbintensität und Kontrastbildung nachbearbeitet.

2.7 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.7.1 Probenaufbereitung

2.7.1.1 Plasmagewinnung

In der Narkose wurden die Venen der Mäuse punktiert und das Blut mit einer 1ml Tuberkulinspritze aufgezogen. Das Blut wurde dann in Lithium-Heparin Kapillarblutentnahmegefäßen mit Trenngel gegeben, bei 3000rpm, bei 4°C 15 Minuten zentrifugiert und das Plasma bei -80°C aufbewahrt (Kabe Labortechnik, GK150).

2.7.1.2 Lymphozytenisolierung aus der Milz

Die Milzen wurden unter Zugabe von 5ml RPMI-Medium und mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 100µm Nylonnetz gedrückt, homogenisiert und nach Abzentrifugation (10 Minuten bei 4°C und 1500rpm) wurde das Pellet mit 1ml Erythrozyten-Lysepuffer (s. Kapitel 2.1) 1 Minute schwenkend inkubiert. Die Lysereaktion wurde mit 20ml Maus-Medium abgestoppt, abzentrifugiert und 1x gewaschen. Anschließend wurden die isolierten Zellen in Maus-Medium bzw. in den entsprechenden Puffern für die Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

2.7.1.3 Gewinnung von Lymphozyten aus dem Lymphknoten

Die entnommenen inguinalen und mesenterischen Lymphknoten wurden aus den Hinterbeinen bzw. dem Darmbereich der Versuchstiere entnommen und in PBS überführt. Zur Aufschließung der Zellen wurden die Lymphknoten anhand eines Stempels durch ein Sieb gedrückt und das entstandene Zelllysate abzentrifugiert und wie die Milzen auf Eis aufbewahrt.

2.7.1.4 Isolation von Transplantat-infiltrierenden Lymphozyten

Die Herzen wurden durch Auseinanderzupfen mit Pinzette und Skalpell mechanisch zerkleinert und für 1 Stunde bei 37°C mit 600U Kollagenase II, 0,75µl DNase in 6ml warmen HBSS-Puffer bei 200rpm geschüttelt. Anschließend wurde der Verdau mit 20ml Mouse-Medium abgestoppt, durch ein steriles Nylonsieb gegeben und für 5 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Nach Aufnahme des Pellets in 8ml warmen Komplett-Medium (ca. 20°C) wurde die Zellsuspension auf ca. 4ml Histopaque Ficoll überschichtet und bei 2000rpm 20 Minuten bei Raumtemperatur (ohne Bremse) zentrifugiert. Die sich in der Interphase angesammelten Lymphozyten wurden abgenommen und 2x mit PBS bei 1500rpm 15 Minuten gewaschen.

2.7.2 Magnetische Sortierung von Zellen (MACS)

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) ist ein Verfahren zur magnetischen Zellseparation. Dabei können spezifische Zellstrukturen mittels Microbeads markiert werden. Microbeads sind etwa 50nm große superparamagnetische Mikropartikel, an die Antikörper gebunden sind. Sie verhindern den Durchfluss der markierten Zellen durch eine von einem starken Magnetfeld umgebene Säule, wobei unmarkierte Zellen unter der Säule aufgefangen werden können. Man unterscheidet eine positive Selektion, bei der die markierten Zellen die Zielzellen sind, und eine negative Selektion, bei welcher die Zielzellen unmarkiert durch die Säule gespült werden.

Die negative Sortierung von murinen NK-Zellen wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die mit Mikrobeads-konjugierten Antikörper und das Equipment für die Zellsortierung (z. B. LS-Separationssäulen, Magnete usw.) wurden von der Firma Miltenyi Biotech verwendet. Einzelzellsuspensionen der isolierten Lymphozyten (meist Splenozyten nach der Erythrozyten-Lyse) wurden mit dem biotinylierten Antikörper-Mix (CD4, CD5, CD8a, CD19, Ly-6G, Ter-119) 10 Minuten bei 4°C inkubiert und dann mit dem Mikrobeads-konjugiertem Mix für 15 Minuten bei 4°C behandelt. Die MACS-Säulen wurden mit MACS-Puffer equilibriert und die Zellen im gleichen Puffer gewaschen. Die Zellen wurden auf MACS-Säulen gegeben, 3x mit MACS-Puffer eluiert/gewaschen. Anschließend wurde die Reinheit der isolierten NK-Zellen per FACS ermittelt. In der Regel wurden Reinheiten zwischen 83 – 94% erreicht.

2.7.3 Zytotoxizitätstest mit PKH26 und 7AAD

Das PKH26 Assay ist eine einfache, schnelle, zuverlässige und vor allem nicht radioaktive Methode zur Untersuchung zellvermittelter Zytotoxizität und damit eine gute Alternative zum oft verwendeten Chrom-(⁵¹Cr)-Release Test. PKH26 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich stabil in die Zellmembran von Zellen integriert und z.B. im FACS gut detektierbar ist [Fischer und Mackensen, 2003].

Zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen aus der Milz (naiv vs. post-Tx) gegenüber allogenen Zellen wurden die Effektor-NK-Zellen mittels der MACS Sortierung (s. Kapitel 2.7.2) angereichert und 2×10^6 Zellen in 1000µl Maus-Medium mit 750U/ml mL-2 in einem well einer 48er Wellplatte bei 37°C über Nacht inkubiert.

Als allogene Targetzellen dienten bestrahlte (ca. 43gy) naive Splenozyten (ohne Erythrozyten-Lyse) der Balb/c Maus (Spender im HTx Experiment). 1×10^6 Targetzellen wurden in 200µl Diluent C Gesamtvolumen mit 0,5µl PKH26-Farbstoff 2,5 Minuten leicht schüttelnd inkubiert, die Färbung mit purem FCS abgestoppt, mit Medium gewaschen und in 1ml Maus-Medium resuspendiert (gewöhnlich bildete sich ein rötliches Pellet). In dreifachen Ansätzen wurden die markierten Targetzellen im Verhältnis 10:1, 5:1 und 2,5:1 mit den Effektorzellen im Gesamtvolumen von ca. 100µl auf einer 96 Wellplatte zusammengegeben und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle für abgetötete Zellen wurden Targetzellen mit 1mM H₂O₂ 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Weiterhin wurde je 1 well nur mit Target- bzw. Effektorzellen befüllt. Die Effektorreaktionen wurden durch Kühlen der Platte auf Eis abgestoppt und vor dem Messen am Durchflusszytometer wurden 2,5µl 7AAD (7-Aminoactinomycin) zu jeder Probe gegeben. 7AAD ist ein mit DNA interkalierender Farbstoff. Die Aufnahme durch eine Zelle ist ein Indikator für Apoptose oder Zelltod, da es nur schwer durch intakte Zellmembranen durchdringen kann.

2.8 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Jede einzelne Zellpopulation ist gekennzeichnet durch spezifische Zelloberflächenantigene und unterschiedliche Streulichteigenschaften. Diese Merkmale sind die Grundlage für die phänotypische Charakterisierung und quantitative Analyse der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dabei wird ein Argonlaser je nach Zellgröße, Oberflächenbeschaffenheit und Granularität der Zelle in charakteristischer Weise als sogenanntes Streulicht abgelenkt und detektiert. Hierbei werden die Zellen über ein Schlauchsystem aufgesaugt und mit Druck in einen sogenannten Mantelstrahl (Sheath) injiziert. Die Zellen werden so beschleunigt und hintereinander aufgereiht, dass sie einzeln in die Messkammer gelangen. Dort wird jede Zelle vom Laserstrahl getroffen. Das gestreute Licht wird bei 180° (FSC = forward light scatter) und bei 90° (SSC = sideward light scatter) gemessen. Die entstehende Streuung ist zelltypspezifisch und abhängig von der Größe der Zellen (FSC) sowie deren Granularität (SSC). So entstehen in der Dot Plot Grafik abgegrenzte Punktwolken für Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozyten. Die Lymphozyten wurden über ein „Gate“ eingegrenzt und somit von den anderen Zelltypen für die Analyse getrennt. Je Ansatz wurden 10.000 bis 50.000 Zellen innerhalb des „Gate“ ausgewertet. Bei der eigentlichen Fluoreszenzanalyse werden die einzelnen Zellen durch einen Laser angeregt und an elektronischen Detektoren vorbeigeführt, die die Fluoreszenzintensität der Zelle registrieren. Die Autofluoreszenz wurde durch Negativkontrollen bestimmt und am Computer diskriminiert. Die prozentuale Verteilung negativer und positiver Zellen wurde dann im Dot Plot ermittelt. Die Expressionsdichte des entsprechenden Antigens wird durch die Höhe der Fluoreszenzintensität (MFI = mittlere Fluoreszenzintensität) repräsentiert. Bei der Auswertung im entsprechenden Computerprogramm (CellQuest bzw. FlowJo) wurde der Dot Plot in Quadranten unterteilt sowie die Verteilung der Zellen und die MFI des jeweiligen Quadranten ermittelt.

Für die Vergleichbarkeit der prozentualen Verteilung von verschiedenen Lymphozytenpopulationen wurde darauf geachtet, dass innerhalb einer Versuchsreihe immer die gleiche Anzahl von Gesamtlymphozyten aufgenommen wurde. Je nach Fragestellung wurden die isolierten Lymphozyten (meist 5×10^5 pro Färbeansatz) in FACS-Puffer aufgenommen und mit entsprechenden Mengen an Antikörper (wurde vorher austitriert) 30 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer konnten die Proben dann im FACS Calibur (BD) gemessen werden.

Die intrazelluläre FoxP3 Färbung wurde nach Herstellerangaben mittels des Miltenyi Buffer Sets durchgeführt. Die mitgelieferten Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer ermöglichen das Eindringen des FoxP3 Antikörpers in die Zelle und somit eine intrazelluläre Markierung.

Antikörper	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
anti-CD3ε	145-2C11	Armenian Hamster IgG	Ebioscience, San Diego, USA
anti-CD8β	H35-17.2	Rat IgG2b, κ	Ebioscience, San Diego, USA
anti-CD25	PC61.5	Rat IgG1, λ	Ebioscience, San Diego, USA
anti-NKp46	29A1.4	Rat IgG2a, κ	Ebioscience, San Diego, USA
anti-NK1.1	PK136	Mouse IgG2a, κ	Ebioscience, San Diego, USA
anti-Ly49H	3D10	Mouse IgG1	Ebioscience, San Diego, USA
anti-CD11b	clone M1/70	Rat IgG2b, κ	Ebioscience, San Diego, USA
anti-CD11c	N418	Armenian Hamster IgG	Ebioscience, San Diego, USA
anti-MHCII	M5/114.15. 2	Rat IgG2b, κ	Ebioscience, San Diego, USA
anti-CD4	GK1.5	Rat IgG2b	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany
anti-FoxP3	3G3	Mouse IgG1	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany

2.9 ZYTOKINBESTIMMUNG

2.9.1 Cytometric Bead Array (CBA)

Um mehrere Zytokine in einer Serumprobe gleichzeitig zu bestimmen, wurde die CBA-Technik verwendet und mit kommerziell erhältlichen Testkits der Firma Bender MedSystem durchgeführt. Dieses Testprinzip basiert auf Latexbeads, die eine unterschiedliche Größe aufweisen und bei der Anregung mit einem Laser unterschiedliche Fluoreszenzen zeigen. Jede dieser Partikelarten ist mit einem Primärantikörper beschichtet, an dem ein Zytokin spezifisch bindet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, jedoch bei halbiertem Probenvolumen und entsprechender Anpassung der Volumina der Reagenzien. Nach Inkubation der Proben mit den Partikeln erfolgte eine weitere Inkubation mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Probenlösung wurde am FACS Calibur (BD) gemessen und mittels der zugehörigen Software ausgewertet.

Verwendet wurden der „Basic Kit mouse/rat FlowCytomix“ und die Einzelkits „Mouse IFNγ FlowCytomix“ und „Mouse RANTES FlowCytomix“.

2.9.2 ELISA (enzyme linked immunoabsorbent-assay)

Mittels ELISA Techniken kann ein bestimmtes Antigen sehr sensitiv und auch quantitativ in einer Probe nachgewiesen werden. Beim Sandwich ELISA ist ein für das nachzuweisende Antigen spezifischer monoklonaler Primärantikörper an einer Festphase in einer 96er Wellplatte gebunden. Nach Zugabe der Probe, bindet das in

dieser Probe enthaltene spezifische Antigen an den immobilisierten Primärantikörper. Der folgende Waschschrift entfernt nun alle nicht gebundenen Substanzen aus der Probe. Anschließend wird ein monoklonaler Sekundärantikörper, an welchem ein Enzym gebunden ist, hinzugefügt. Dieser bindet spezifisch an das nachzuweisende Antigen an ein anderes Epitop als der Primärantikörper. Das erneute Waschen entfernt nicht gebundene Sekundärantikörper. Das anschließend hinzugefügte Substrat wird durch das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym in ein farbiges Produkt umgewandelt. Die Anwesenheit des Antigens wird somit durch einen Farbumschlag sichtbar und kann durch photometrische Messung der Farbintensität auch quantifiziert werden.

Für die Detektion von Interleukin 15 und Granzyme B aus den Serumproben wurden Kits von eBioscience („Mouse-IL15 ELISA Ready-SET-GO!“ und „Mouse-Granzyme ELISA Ready-SET-GO!“) verwendet und nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Detektion der Signale erfolgte im Tecan Plattenleser.

2.10 STATISTIK

Die Daten der *in vitro* und *ex vivo* Experimente wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Für die statistischen Analysen wurde die Software GraphPad Prism 5 für Windows (GraphPad software Inc., La Jolla, USA) verwendet. Der Vergleich der Überlebenskurven wurde über den Log-Rank Test ausgewertet. Für den Vergleich zweier Gruppen zu den gleichen Zeitpunkten wurde der unpaired T-Test angewandt. Die Zeitkinetiken der einzelnen Gruppen (Mäusestämme) wurden über eine Varianzanalyse (one-way ANOVA) analysiert. P-Werte kleiner oder gleich 0,05 wurden als statistisch unterschiedlich betrachtet.

3 ERGEBNISSE

3.1 NATÜRLICHE KILLERZELLEN UND DENDRITISCHE ZELLEN INFILTRIEREN VOR T-ZELLEN IN DAS ALLOTRANSPLANTAT

Abstoßungsreaktionen zeichnen sich morphologisch durch eine zelluläre Infiltration von verschiedenen Lymphozytenpopulationen aus. Eine kinetische Analyse von Transplantat-infiltrierenden Lymphozyten sollte Aufschluß darüber liefern, welche Zellpopulationen zu welchem Zeitpunkt des Rejektionsverlaufes eine tragende Rolle spielen.

Da bei fehlender Fremd-Antigenerkennung im Falle genetisch identischer Individuen keine zelluläre Infiltration stattfinden sollte, dienten syngene (C57BL/6 auf C57BL/6) Transplantationen als Negativkontrolle von allogenen (Balb/c auf C57BL/6) Herztransplantationen.

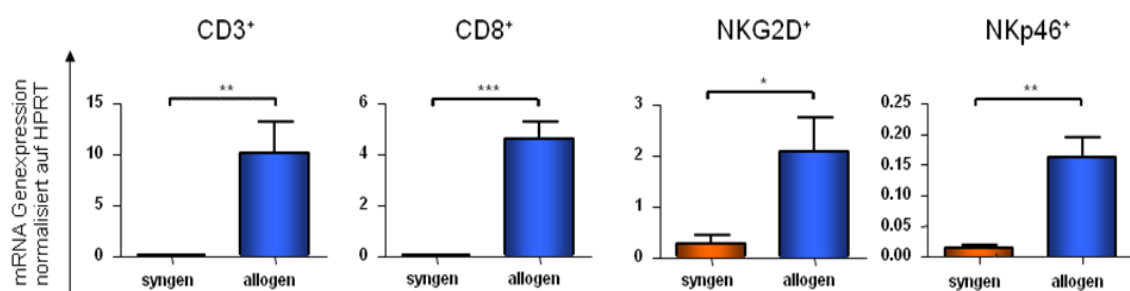


Abb. 12: In syngen Herztransplantaten sind keine Lymphozyten zu detektieren

Die mRNA-Expression verschiedener Lymphozyten-Oberflächenrezeptoren wurde an Tag 5 nach der Transplantation aus geernteten allogenen Herzen ermittelt. In der syngen Kontrollgruppe wurden im Gegensatz zur allogenen Gruppe für alle untersuchten T-Zell- und NK-Zell-typischen Rezeptoren kaum mRNA-Moleküle detektiert. T-test: * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Bei den untersuchten für T- und NK-Zellen charakteristischen Oberflächenmolekülen CD3, CD8, NKG2D und NKp46 konnte im Gegensatz zu den Allotransplantaten in den syngen Kontrollen keine signifikant erhöhte mRNA-Expression detektiert werden (s. Abb. 12). Die wenigen in syngen Transplantaten nachgewiesenen Zellen setzen sich vermutlich aus Zellen aus einem geringen unspezifischen subepikardialen Infiltrat zusammen, welches sich durch ein Operationstrauma erklären lässt, sowie aus „Bystander“-Lymphozyten in den Blutgefäßen.

Zur Beurteilung der jeweiligen Rolle von T-Zellen, NK-Zellen und Dendritischen Zellen im Verlauf einer akuten Abstoßung von murinen allogenen Herztransplantaten, wurden die prozentualen Verhältnisse der Transplantat-infiltrierenden Lymphozyten an Tag 5 nach der Transplantation und am Tag der Abstoßung (Tag Rx) bestimmt.

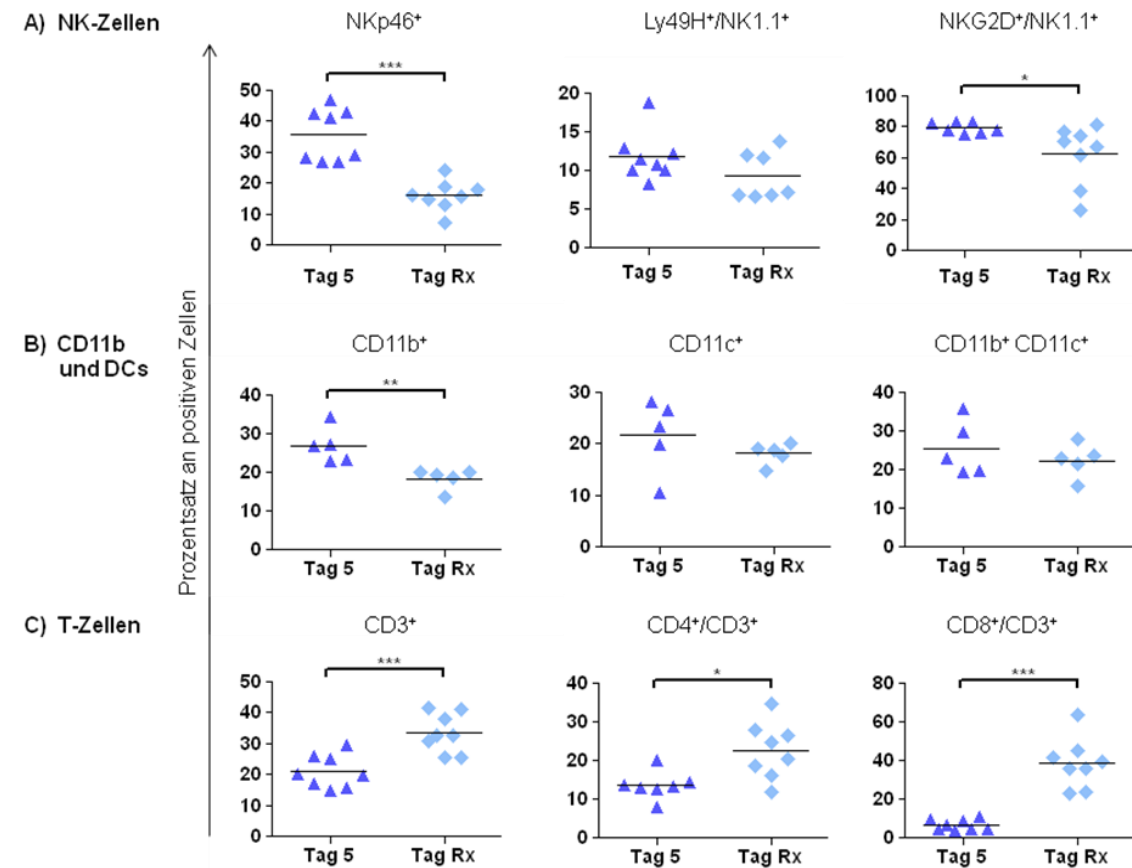


Abb. 13: Zellfrequenzen der Transplantat-infiltrierenden Lymphozytenuntergruppen in C57BL/6 Empfängertieren
Die prozentualen Angaben der $NKp46^+$, $CD11b^+$, $CD11c^+$, $CD3^+$ bzw. doppelpositiven $CD11b^+CD11c^+$ Zellen beziehen sich auf die Gesamtzahl der aufgenommenen Lymphozytenpopulation. Die $Ly49H^+$ und $NKG2D^+$ Frequenzen spiegeln den Anteil ihrer Verteilung auf $NK1.1^+$ Zellen dar. Die $CD4^+$ und $CD8^+$ Korezeptoren wurden auf $CD3^+$ T-Zellen bezogen. Für die Untersuchungen von NK-Subpopulationen wurde der $NK1.1$ Rezeptor verwendet. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der $NK1.1^+$ Zellen auch $NKp46^+$ exprimiert (Daten nicht gezeigt).

T-test: * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

- A) NK-Zellen: Am Tag 5 nach der Transplantation wird eine signifikant höhere Zellfrequenz an NK-Zellen im Allograft detektiert als am Tag der Abstoßung
- B) $CD11b$ (NK-Zellen, Makrophagen, Granulozyten) und DCs: Auch DCs und $CD11b^+$ Zellen infiltrieren zu Beginn des Abstoßungsprozesses und sind nach der Rejektion des Alloherzens nur noch in reduzierter Frequenz detektierbar.
- C) T-Zellen: Im Gegensatz zu den NK-Zellen und DCs akkumulieren T-Zellen erst am Tag der Abstoßung im Transplantat

In Übereinstimmung mit ihrer Rolle als frühe Effektoren des angeborenen Immunsystems wurden $NKp46^+$ NK-Zellen in erhöhter Konzentration am Tag 5 nach der Transplantation und mit signifikant reduzierter Infiltration zum Tag der Abstoßung hin im Allograft detektiert (s. Abb. 13 A, $36 \pm 3\%$ vs. $16 \pm 2\%$). Ein zum Tag der

Rejektion hin sinkendes kinetisches Profil zeigten auch die NK-Zell-Subpopulation der $Ly49H^+/NK1.1^+$ und $NKG2D^+/NK1.1^+$ Zellen. Der Oberflächenmarker CD11b (Mac-1 α) entspricht dem Komplementrezeptor 3 und wird nicht nur von Makrophagen, sondern auch von Granulozyten und Natürlichen Killerzellen exprimiert. Am Tag 5 postoperativ wurden im Vergleich zum Tag der Abstoßung signifikant mehr CD11b $^+$ Zellen aus dem Allograft isoliert (Abb. 13 B). Die doppelpositiven CD11b $^+$ CD11c $^+$ Dendritischen Zellen, welche ebenfalls früh während der Immunantwort benötigt werden, um durch Antigenpräsentierung auf ihren MHC-Komplexen T-Zellen zu aktivieren, infiltrieren massiv am Tag 5 und zeigen eine sinkende Expression im abgestoßenen Gewebe (s. Abb. 13 C). CD4 $^+$ /CD3 $^+$ T-Zellen wurden hingegen erst zum Tag der Abstoßung in doppelt so hohen Frequenzen detektiert ($14 \pm 1\%$ an Tag 5 vs. $23 \pm 3\%$ an Tag Rx). CD8 $^+$ T-Zellen zeigen am Tag der Abstoßung sogar eine 4fach höhere Infiltrationsrate im Vergleich zu Tag 5 ($7 \pm 1\%$ vs. $38 \pm 4\%$).

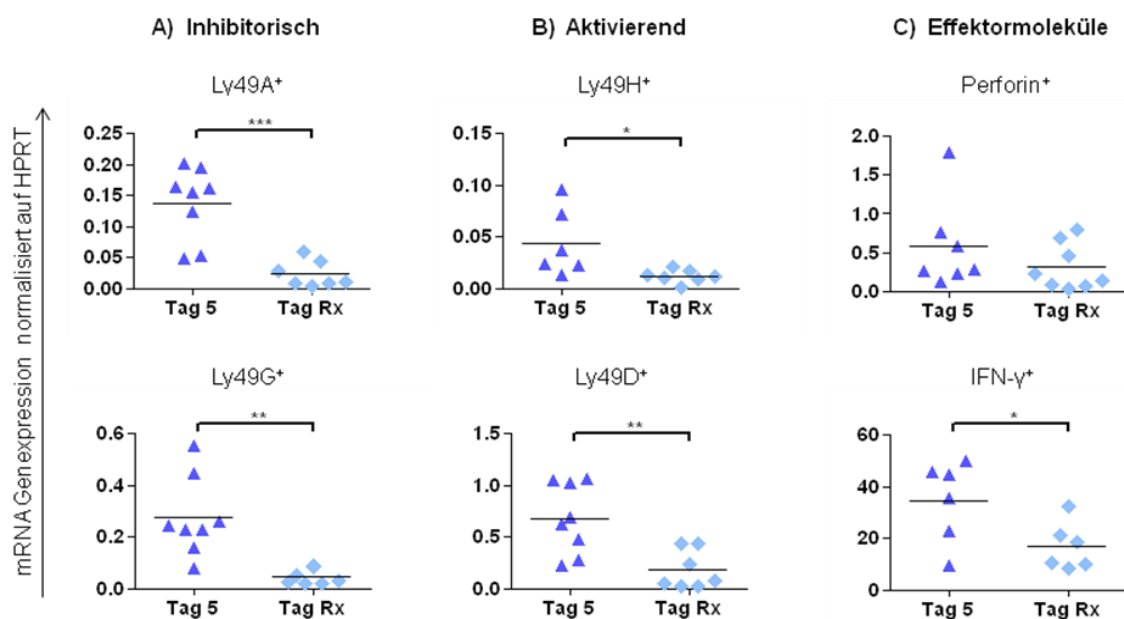


Abb. 14: RT-PCR Analysen verschiedener Ly49 Rezeptoren und Effektormoleküle von Allotransplantaten aus C57BL/6 Empfängern

Die mRNA-Expression sowohl der inhibierend wirkenden Ly49A und Ly49G als auch der aktivierenden Ly49H und Ly49D NK-Zellrezeptoren ist am Tag 5 nach der Allotransplantation in den Herzen signifikant erhöht im Vergleich zu den abgestoßenen Transplantaten (A und B). Auch die Effektormoleküle Perforin und IFN- γ zeigen den gleichen kinetischen Verlauf (C). T-test: * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Für eine differenziertere Charakterisierung der infiltrierenden NK-Zell-Untergruppen, wurden die Transplantate auf aktivierende und inhibierende NK-Zellrezeptoren und ihr Aktivierungsstatus anhand des Zytokins IFN- γ und des Effektormoleküls Perforin untersucht. Da zum Beginn der Arbeit ein Großteil der anti-Ly49 Antikörper nicht kommerziell erhältlich waren, wurden die Expressionsprofile anhand von RT-PCR Daten erstellt.

Die inhibierenden Rezeptoren Ly49A und Ly49G werden sowohl in der Balb/c als auch in der C57BL/6 Maus exprimiert [Anderson *et al.*, 2005]. Da die Blutgefäße der Transplantate aber vor der Entnahme gründlich gespült werden, kann davon ausgegangen werden, dass detektierte Signale tatsächlich von ins Gewebe infiltrierten Zellen stammen (s. Abb. 14 A). Ly49H und Ly49D gehören zu der Gruppe der aktivierend wirkenden NK-Zell-Rezeptoren und werden nur von den C57BL/6 Rezipienten exprimiert (s. Abb. 14 B). Eine Detektion dieser Empfänger-spezifischen Rezeptoren im Balb/c Spenderherzen weist daher eindeutig eine Infiltration dieser NK-Subpopulationen nach. Interessanterweise scheinen NK-Zellen unabhängig davon, ob sie inhibitorische oder aktivierende Rezeptoren tragen, vermehrt an Tag 5 in das Transplantat einzuwandern und zum Tag der Abstoßung die Herzen wieder zu verlassen bzw. abzusterben. Das proinflammatorische Zytokin IFN- γ und das zytolytische Molekül Perforin können Anhaltspunkte für die Aktivität von zytotoxischen Zellen, wie z.B. NK-Zellen und den Aktivierungszustand von T-Zellen bei einer Immunantwort liefern. Das erhöhte NK-Zellinfiltrat an Tag 5 korreliert mit der gesteigerten IFN- γ und Perforin-Produktion. Diese Beobachtung könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die NK-Zellen nicht nur einwandern, sondern auch aktiv am Abstoßungsprozess mitwirken.

3.1.1 Die NK-Zell-Komposition wird während des Abstoßungsprozesses auch in den peripheren lymphatischen Organen moduliert

Die Beobachtung der Abnahme von NK-Zellen und DCs bei gleichzeitiger Zunahme der T-Zellen von Tag 5 post Transplantation zum Rejektionstag hin, warf die Frage auf, woher die Effektorzellen stammen und ob sie im Transplantat verbleiben oder in andere Organe auswandern.

3.1.1.1 Kinetische Regulation der Infiltration von Lymphozyten aus der Milz

Die Isolation und durchflusszytometrische Analyse von NK-Zellen aus naiven, an Tag 5 nach Transplantation und vom Tag der Abstoßung stammenden C57BL/6 Milzen ergab eine signifikante Abnahme der Zellfrequenz von untransplantierten Tieren hin zu Tag 5 und einen anschließenden signifikanten Anstieg der NKp46⁺ und Ly49H⁺/NK1.1⁺ Splenozyten bei abgestoßenen Herzen (s. Abb. 15 A).

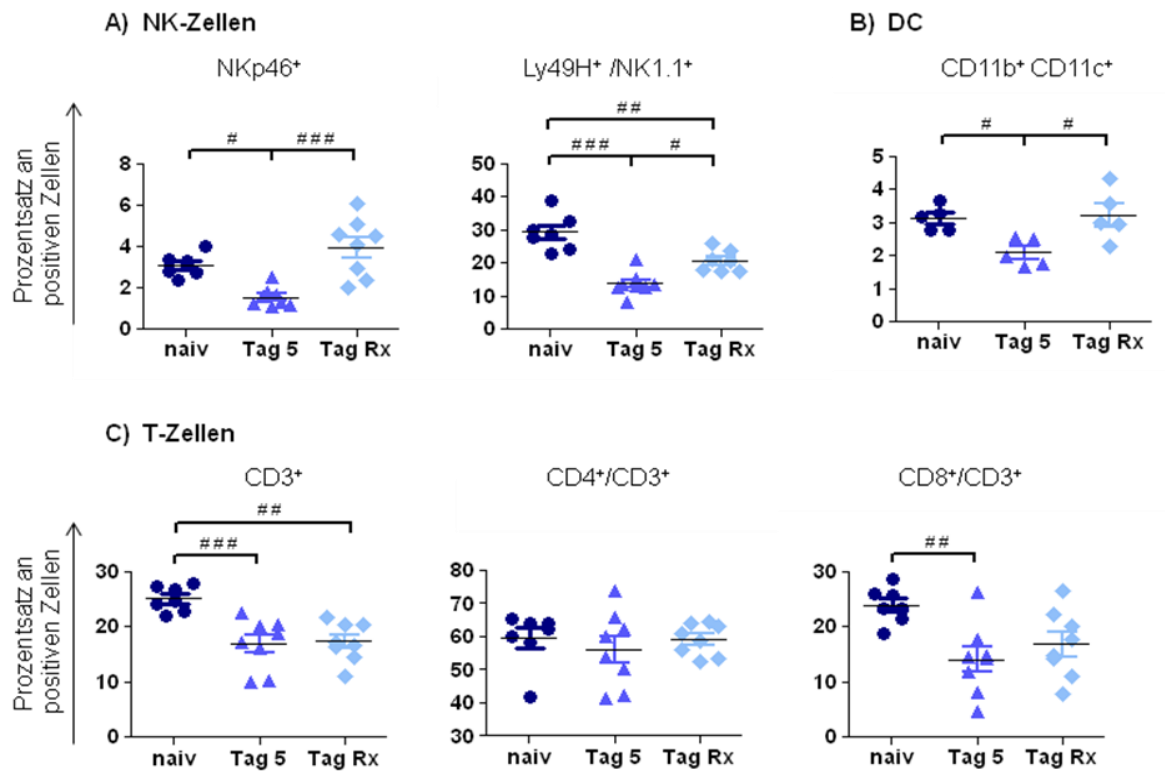


Abb. 15: Die Verteilung von NK-Zellen, DCs und T-Zellen in der Milz von C57BL/6 Tieren im naiven Zustand und nach Transplantation an Tag 5 bzw. Tag der Abstoßung

An den drei definierten Zeitpunkten wurden die Lymphozyten aus den Milzen der Wildtyp-tiere isoliert und die Zellfrequenz anhand spezifischer Antikörper gegen NK-Zell-, DC- und T-Zell-typischer Rezeptoren ermittelt. Die kinetischen Profile der untersuchten Lymphozyten in der Milz zeigen eine Reduzierung von NK-, T- und Dendritischen Zellen an Tag 5 nach der Transplantation und eine Akkumulation der Lymphozyten zum Tag der Abstoßung hin. ANOVA-test: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$

Dendritische Zellen werden wie NK-Zellen zu den frühen Akteuren des Immunsystems gezählt. Auch bei dieser Zellpopulation beobachten wir eine Reduzierung der aus der Milz isolierten Zellen an Tag 5 nach der Transplantation bei gleichzeitiger Infiltration von Transplantat-infiltrierenden $CD11b^+CD11c^+$ doppelpositiven Lymphozyten (s. Abb. 15 B und Abb. 13 B).

Bei der Untersuchung der T-Zellen (s. Abb. 15 C) konnte eine signifikante Abnahme der Zellfrequenz von $CD3^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen nach Transplantation im Vergleich zu naiven Milzen gezeigt werden. Die Milzen der C57BL/6 Tiere wiesen nach der Transplantation jedoch im Verlauf der Abstoßung konstante T-Zellfrequenzen auf.

3.1.1.2 Kinetik der Mobilisierung von Lymphozyten aus Lymphknoten

Lymphknoten werden als zusätzlicher Ort der NK-Zell-Reifung und sogar Produktion diskutiert [Ferlazzo und Munz, 2004]. Die Autoren nehmen an, dass bei Entzündungsreaktionen die NK-Zellen über Chemokinrezeptoren aus dem Endothelium an den Inflamationsherd wandern können. Zur Beantwortung der Frage, ob die in

das Transplantat-infiltrierenden NK-Zellen aus den Lymphknoten stammen, wurden diese von naiven, nach Tag 5 und Tag der Abstoßung getöteten Rezipienten-Mäusen entnommen und durchflusszytometrisch analysiert.

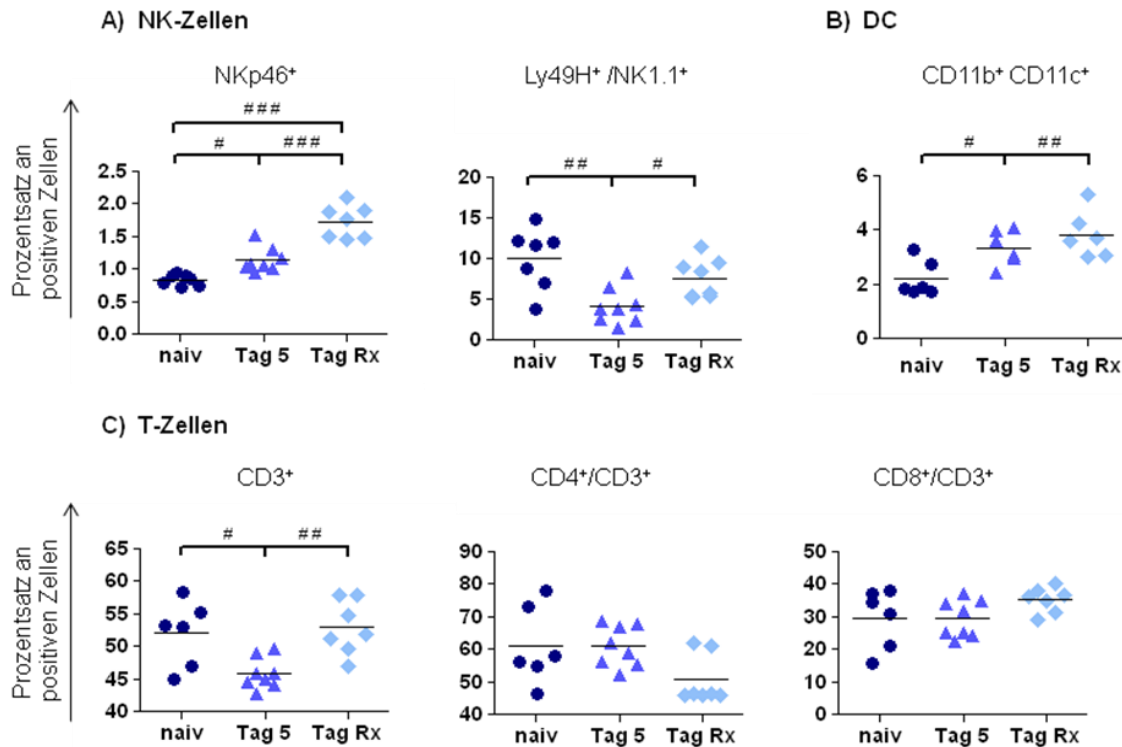


Abb. 16: Die Verteilung von NK-, DCs und T-Zellen und deren Untergruppen in Lymphknoten von C57BL/6 Tieren im naiven Zustand und nach Transplantation an Tag 5 bzw. Tag der Abstoßung

An den drei definierten Zeitpunkten wurden die Lymphozyten aus den Lymphknoten der Wildtyp-Tiere isoliert und die Zellfrequenz anhand spezifischer Antikörper gegen NK-Zell- und T-Zell-typischer Rezeptoren ermittelt.

ANOVA-test: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$

In naiven Lymphknoten werden wesentlich weniger NKp46⁺ und CD11b⁺CD11c⁺ Zellen detektiert als nach der Transplantation (s. Abb. 16 A und B). Vergleichbar mit den Daten aus den Milzen werden auch in den Lymphknoten der Tiere mit abgestoßenem Allotransplantat eine wesentlich höhere Frequenz an NK- und Dendritischen Zellen isoliert als der an Tag 5 geernteten Organe. Der Anteil der Ly49H⁺/NK1.1⁺ Zellen hingegen, wird nach der Transplantation in den Lymphknoten geringer und erhöht sich bei voranschreitender Abstoßung wieder signifikant. Bei Betrachtung der T-Zellen und deren Untergruppen zeigt die Gesamtpopulation der CD3⁺ T-Zellen zwar eine Abnahme der T-Zellfrequenz der am Tag 5 nach der Implantation der Herzen entnommenen Lymphknoten, doch bleiben die Werte bei den Untergruppen der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen vor und nach Transplantation konstant (s. Abb. 16 C). Aus den gewonnenen Daten lässt sich somit für T-Zellen keine eindeutige Aussage über deren

Migrationsverhalten zwischen den Lymphknoten und anderen Organen in der frühen Phase der Abstoßung ableiten.

Die kinetischen Analysen im Allotransplantat, in der Milz und in den Lymphknoten wurden ebenfalls an NCR1-defizienten Tieren durchgeführt. Die ermittelten kinetischen Profile aus naiven, an Tag 5 und Tag der Abstoßung Tieren zeigten in den mRNA- und durchflusszytometrischen Analysen zu den Wildtyptieren vergleichbare Verläufe. Daher wurden nur die Daten der Wildtypgruppe graphisch dargestellt.

3.2 DIE VERTEILUNG DER VERSCHIEDENEN LYMPHOZYTENPOPULATIONEN BLEIBT DURCH DIE NCR1-DELETION UNVERÄNDERT

Die vergleichende Analyse der gentechnisch veränderten Tiere zu ihrem Wildtyp im naiven Zustand ist von entscheidender Bedeutung. Es soll damit nachgewiesen werden, dass eine NCR1-Deletion in naiven Tieren zu keiner modifizierten Lymphozytenverteilung führt, sodass die Veränderung der Überlebensraten der operierten Tiere tatsächlich durch die Modulation der Abstoßungsmechanismen nach der Transplantation erklärt werden kann.

Die Verteilung der Lymphozytenpopulationen in der Milz und den Lymphknoten wurde in naiven C57BL/6 (BL6) und NCR1-defizienten (NCR) Mäusen mittels durchflusszytometrischer Analyse verschiedener Oberflächenmarker miteinander verglichen (s. Abb. 17). Die Ergebnisse vorangegangener Studien konnten bestätigt werden, dass die Deletion des NCR1 Gens keinen Einfluss auf das T-Zellrezeptorrepertoire hat [Gazit *et al.*, 2006]. Anhand der intrazellulären FoxP3-Färbung konnte ferner demonstriert werden, dass auch der Anteil der *ex vivo* isolierten, unaktivierten regulatorischen T-Zellen (Treg) in beiden Mäusestämmen miteinander vergleichbar ist. Darüber hinaus konnten durch die Verwendung des monoklonalen NCR1 Antikörpers im Wildtyp nachgewiesen werden, dass das in die NCR1 kodierende Sequenz eingefügte GFP-Signal der NCR1^{GFP/GFP} Maus direkt mit der NKp46 Expression der Wildtyptiere korreliert ($3,09 \pm 0,5\%$ NKp46⁺ vs. $3,04 \pm 1\%$ GFP⁺ in der Milz bzw. $0,84 \pm 0,08\%$ NKp46⁺ vs. $0,80 \pm 0,2\%$ GFP⁺ im Lymphknoten). Die genetische Manipulation führte zu keiner Deletion von NK-Zellen. In beiden getesteten Organen konnte somit kein signifikanter Unterschied in der Verteilung spezifischer NK-Zell-, T-Zell- und DC-Marker zwischen den Wildtyp und den NCR1-defizienten Tieren gemessen werden.

Zelltyp		Milz		Lymphknoten	
		naive BL6 [%]	naive NCR [%]	naive BL6 [%]	naive NCR [%]
T-Zellen	CD3 ⁺	25,07 ± 2,07	24,89 ± 2,90	52,02 ± 4,61	56,24 ± 3,24
	CD4 ⁺ /CD3 ⁺	59,43 ± 7,57	66,11 ± 7,34	61,15 ± 10,92	54,86 ± 5,18
	CD8 ⁺ /CD3 ⁺	23,84 ± 2,99	22,33 ± 3,31	29,58 ± 8,33	34,09 ± 4,86
Tregs	CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ /CD4 ⁺	3,03 ± 0,50	2,45 ± 0,71	4,01 ± 1,87	4,12 ± 1,77
NK-Zellen	GFP ⁺ bzw. NKp46 ⁺	3,09 ± 0,50	3,04 ± 0,91	0,84 ± 0,08	0,80 ± 0,24
DCs	CD11c ⁺	3,97 ± 0,52	3,49 ± 0,33	2,74 ± 0,42	2,20 ± 0,31
	CD11b ⁺ CD11c ⁺	3,13 ± 0,34	2,43 ± 0,10	2,20 ± 0,60	2,05 ± 0,56

Abb. 17: Vergleich naiver Lymphozytenpopulationen in NCR1^{GFP/GFP} und C57BL/6 Tieren

Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten naiver NCR1-defizienter Tiere und Wildtypmäuse wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Lymphozytenmarker gefärbt und deren prozentuale Verteilung bezogen auf die Gesamtl lymphozytenpopulation mittels durchflusszytometrischer Messung ermittelt ($n > 5$). Die prozentualen Angaben der CD3⁺, GFP⁺, NKp46⁺, CD11c⁺ bzw. doppeltpositiven CD11b⁺CD11c⁺ Zellen beziehen sich auf die Gesamtzahl der aufgenommenen Gesamtl lymphozytenpopulation. Die CD4⁺ und CD8⁺ Frequenzen spiegeln den Anteil ihrer Verteilung auf CD3 T-Zellen dar. Zur Bestimmung des Anteils von Tregs wurden CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozyten auf CD4⁺ T-Zellen bezogen. Die Verteilung der untersuchten Lymphozytenpopulationen in den transgenen NCR1^{GFP/GFP} Tieren unterscheidet sich kaum von der Wildtypkohorte.

3.2.1 NCR1-defiziente Mäuse exprimieren Ly49 NK-Zellrezeptoren

Zur Untersuchung des Einflusses der NCR1-Deletion auf weitere aktivierende und inhibierende NK-Zellrezeptoren wurden in naiven Milzen der NCR^{GFP/GFP} und C57BL/6 Mäuse die Expression der Ly49 Rezeptoren analysiert.

Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte nachgewiesen werden, dass eine NCR1-Deletion in naiven Tieren die Expression von aktivierenden (Ly49D und Ly49H) und inhibierenden Ly49 Rezeptoren (Ly49A und Ly49G) nicht beeinträchtigt (s. Abb. 18). Vielmehr konnte gezeigt werden, dass in den Milzen naiver NCR1-defizienter Tiere die Ly49 NK-Zellrezeptoren in gleichen Anteilen exprimiert werden wie in der C57BL/6 Kontrollgruppe. Eine Aktivierung von NK-Zellen sollte daher auch in dem NCR1^{GFP/GFP} Modell über die hemmenden und aktivierenden Ly49 NK-Zellrezeptoren möglich sein.

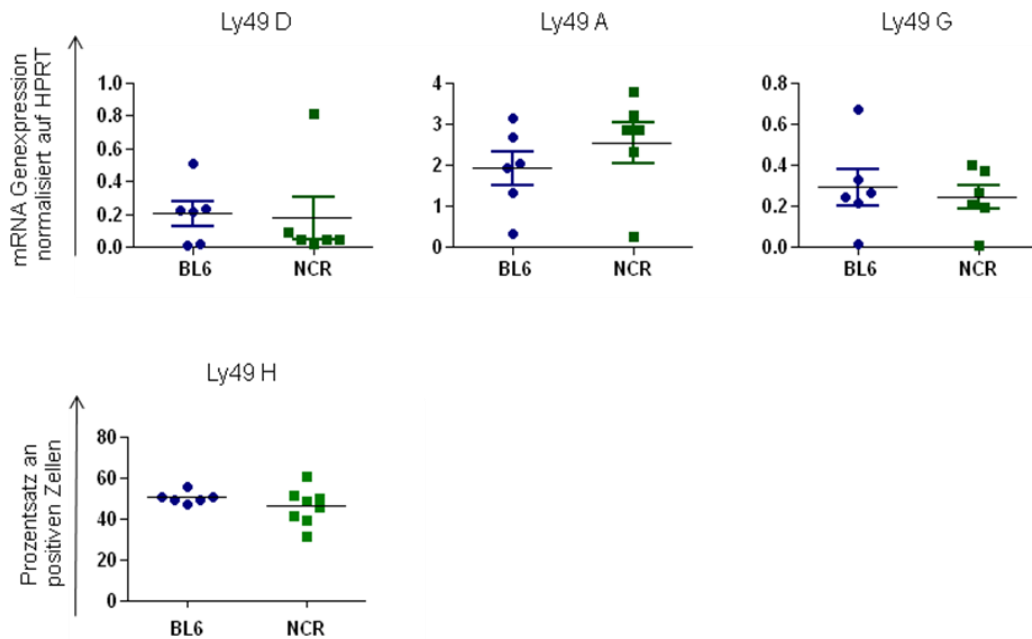


Abb. 18: Vergleich der Expression von inhibierenden und aktivierenden Ly49 Rezeptoren in der Milz von NCR1^{GFP/GFP} und C57BL/6 Mäusen

Mittels RT-PCR Analysen wurden in naiven Milzen der transgenen NCR1^{GFP/GFP} und Wildtypiere die inhibierenden Ly49D und Ly49G bzw. der aktivierende Ly49D NK-Zellrezeptoren detektiert. Für eine Untersuchung der Oberflächenexpression von Ly49 Rezeptoren stand nur ein Antikörper gegen den Ly49H Rezeptor kommerziell zur Verfügung. NCR1-defiziente Mäuse unterscheiden sich in der Expression der Ly49 Rezeptoren nicht von Wildtypmäusen. T-test: nicht signifikant

3.3 NCR1-DEFIZIENTE MÄUSE STOßEN ALLOGENE HERZTRANSPLANTATE VERZÖGERT AB

In der vorliegenden Studie sollte anhand der transgenen NCR1^{GFP/GFP} Maus, die durch eine genetisch verankerte Deletion des NK-Zell-spezifischen NCR1 (NKp46) Rezeptors charakterisiert ist, die Rolle von NK-Zellen in den Rejektionsprozessen allogener Herztransplantate untersucht werden. Zur Ermittlung der Mittleren Überlebenszeit (MÜZ) von Transplantaten wurden Balb/c Spenderherzen (bzw. C57BL/6 bei der syngen Kontrolle) mittels abdominal heterotoper Herztransplantationen in C57BL/6 WT, NCR1^{GFP/GFP} und NCR1^{+GFP} Empfängertiere implantiert. Als Tag der Abstoßung wurde der Tag definiert, an dem durch manuelles Palpieren keine Schlagfrequenz des Allotransplantates mehr zu spüren war.

Eine syngene Herztransplantation führte durchweg zu einer Akzeptanz des Transplantats für über 100 Tage. Während die Wildtypmäuse am Tag 7 ihre Herztransplantate abstießen (MÜZ $6,86 \pm 0,35$ Tage), akzeptierten NCR1-defiziente Empfänger ihre allogenen Herzen 2 Tage länger (MÜZ $9,0 \pm 0,53$ Tage). Die heterozygote NCR1^{+GFP} Empfängergruppe rejizierte die Balb/c Herzen mit einer der Wildtypkohorte vergleichbaren Kinetik (MÜZ $7,0 \pm 0,58$ Tage).

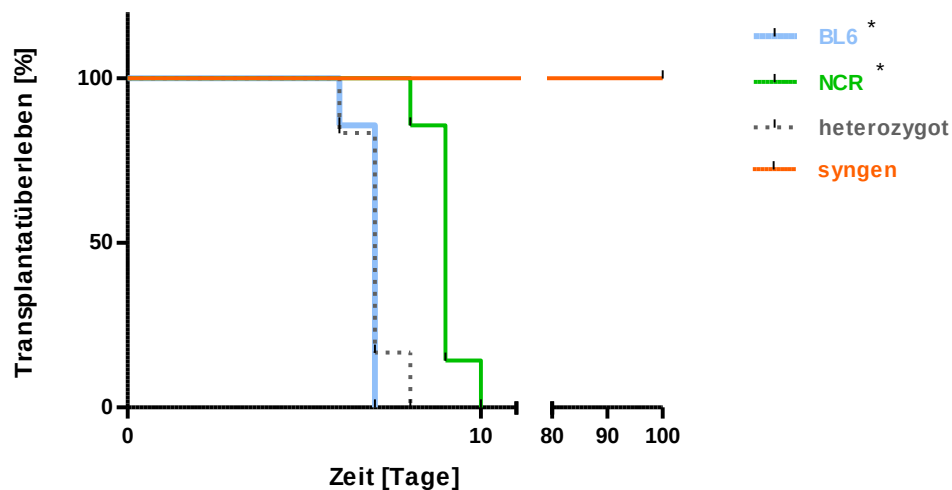


Abb. 19: Transplantat-Überlebenskurven von syngen und allogenen Herztransplantationen

Das Überleben sygener C57BL/6 auf C57BL/6 und allogener C57BL/6, $NCR^{GFP/GFP}$ und $NCR^{+/GFP}$ Herztransplantate wurde mittels Fingerpalpation überwacht. Bei syngen Transplantationen wurde das Isograft dauerhaft akzeptiert ($n = 6$). Die homozygot ($n = 7$), nicht aber die heterozygot ($n = 5$), $NCR1$ -defizienten Tiere stoßen ihre Allotransplantate durchschnittlich 2 Tage verzögert im Vergleich zu den Wildtypen ab ($n = 7$).

* $p = 0,0004$ im Log Rank-Test

3.3.1 Transplantatüberleben mit Kostimulationsblockade

CTLA-4-Ig ist ein Fusionsprotein aus dem zytotoxischen T-Lymphozyten assoziierten Antigen 4 und dem humanen IgG1. Durch seine stärkere Bindungsaffinität zu den Liganden CD80/CD86 kann es das kostimulatorische CD28-Molekül verdrängen und somit die T-Zellaktivierung inhibieren.

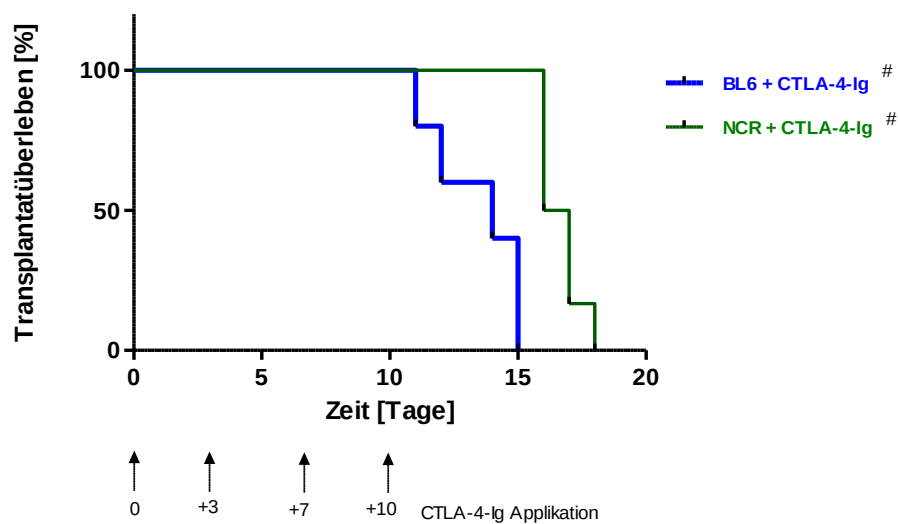


Abb. 20: Transplantatüberleben von allogenen Herzen nach kostimulatorischer Blockade

C57BL/6 und $NCR^{GFP/GFP}$ Empfänger wurden entsprechend dem abgebildeten Schema mit mCTLA-4-Ig behandelt und das Transplantatüberleben täglich durch palpieren überwacht ($n = 6$). Die kostimulatorische Blockade verlängerte in beiden Mäusestämmen das Überleben der allogenen Herzen, wobei die $NCR1$ -deletierten Tiere, wie bei unbehandelten Mäusen in Abb. 19, eine verzögerte Abstoßung zeigen. # $p = 0,0011$ im Log Rank-Test.

Die Injektion von murinem CTLA-4-Ig führte sowohl in C57BL/6 WT als auch NCR1^{GFP/GFP} Tieren zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens. Mit Kostimulationsblockade stießen die Herzen der Wildtyptiere durchschnittlich 7 Tage verzögert im Vergleich zu den unbehandelten Rezipienten ab (MÜZ $6,86 \pm 0,35$ vs. $13,4 \pm 1,62$ Tage, $p = 0,0016$). Die Administration von CTLA-4-Ig führte bei den NCR1-defizienten Mäusen mit einer ca. achttägigen Verzögerung (MÜZ $9,0 \pm 0,53$ vs. $16,67 \pm 0,75$ Tage, $p = 0,0004$) zu keiner deutlich längeren Transplantatakzeptanz verglichen mit der Wildtypgruppe (vergleiche Abb. 19 und 20).

3.4 NK-ZELLEN AUS TRANSPLANTIERTEN TIEREN SIND ZYTOTOXISCHER ALS NAIVE NK-ZELLEN

Die natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen wurde prä- und postoperativ am Durchflusszytometer ermittelt. Dazu wurden IL-2 aktivierte NK-Zellen naiver und transplantierte NCR1^{GFP/GFP} und C57BL/6 Tiere mit bestrahlten und einem Farbstoff markierten allogenen Balb/c Splenozyten inkubiert und die prozentualen Killingraten ermittelt.

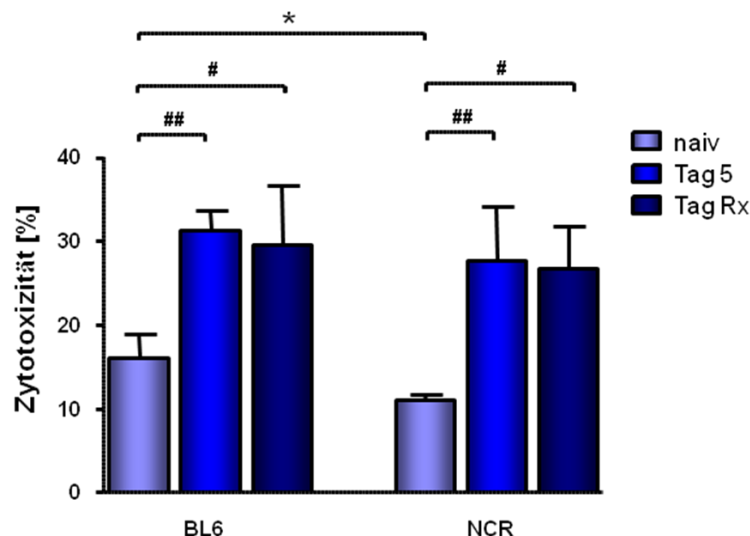


Abb. 21: Zytotoxische Aktivität von C57BL/6 und NCR^{GFP/GFP} NK-Zellen gegenüber allogener Balb/c Targetzellen
 In diesem Assay wurde die Zytotoxizität von naiven, an Tag 5 und Tag der Abstoßung (Rx) nach der Herztransplantation isolierten NK-Zellen bestimmt. Während die NK-Zellen der Wildtypmäuse effizient Balb/c Zellen lysieren, zeigen Mäuse mit funktionsuntüchtigem NCR1 Gen eine verminderte Killingrate. Splenozyten aus transplantierten Tieren weisen eine stark aktivierte Zytotoxizität im Vergleich zu naiven Zellen auf. Zusammengefasst sind die repräsentativen Ergebnisse für $n = 4$ bei dem E:T Verhältnis von 1:10. # ANOVA, * t-Test

Die Daten zeigen eine signifikant geringere zytotoxische Aktivität in naiven NK-Zellen, denen der zytotoxische NK-Zellmarker NCR1 fehlt. Weiterhin demonstrieren die Experimente eine Verdoppelung der Killingkapazität der NK-Zellen an Tag 5 nach der

Transplantation und am Tag der Abstoßung (Rx) in beiden Mäusestämmen. Interessanterweise konnte in den transplantierten Tieren kein signifikanter Unterschied zwischen den NCR1-defizienten und den C57BL/6 Mäusen festgestellt werden, wobei die NCR1^{GFP/GFP} Gruppe dennoch tendenziell eine geringere Zytotoxizität aufweist.

3.5 ALLOGENE HERZTRANSPLANTATE ZEIGEN EIN LEUKOZYTÄRES INFILTRAT

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen und NK1.1⁺CD3⁻ bzw. DX5⁺CD3⁻ NK-Zellen allogene Herztransplantate an Tag 5 nach der Operation infiltrieren [Maier *et al.*, 2001]. Die transgene NCR1^{GFP/GFP} Maus ist durch das NCR1 deletierende Einfügen von GFP als Reportergen charakterisiert. Mit dessen Hilfe und der NK-Zellspezifität von Nkp46 lassen sich alle Empfänger-NK-Zellen jederzeit eindeutig über das GFP-Signal identifizieren.

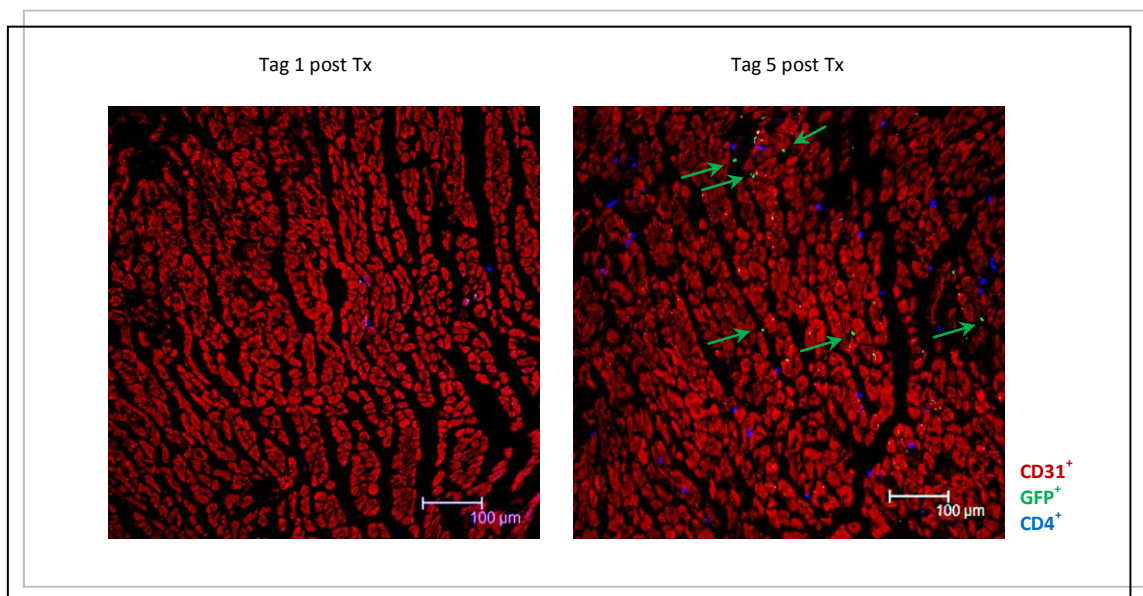


Abb. 22: Transplantat-infiltrierende NK- und CD4⁺ T-Zellen in Allotransplantaten von NCR1^{GFP/GFP} Empfängern
Kryoschnitte von an Tag 1 bzw. Tag 5 nach der Transplantation entnommenen Herzen der NCR1-defizienten Tiere wurden mit anti-CD4, anti-CD31 und anti-GFP gefärbt. Im Gegensatz zur Frühphase an Tag 1 nach der Transplantation konnte an Tag 5 eine Infiltration von CD4⁺ T-Zellen und NCR1⁺ NK-Zellen anhand des GFP-Reportergens nachgewiesen werden.

Zur Darstellung des zellulären Infiltrats wurden Kryoschnitte von an Tag 1 und Tag 5 geernteten Allografts mit monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen das Oberflächenantigen CD4 und das Reportergen GFP markiert. Um falschpositive Infiltrate auszuschließen, die sich in den Blutgefäßen der Herzen festgesetzt haben, wurden die Transplantate vor der Entnahme gründlich mit einer Heparin-

Kochsalzlösung gespült. Ferner wurde zur visuellen Darstellung von Endothelzellen und damit auch der Blutkapillaren ein Antikörper gegen CD31 verwendet.

Da einen Tag nach der Transplantation noch keine infiltrierenden Lymphozyten und eine unauffällige Myokardstruktur detektiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass keine hyperakute Abstoßung stattgefunden hat bzw. keine mikrochirurgischen Probleme das Transplantatgewebe geschädigt haben. In den allogenen Herzen zeigt sich hingegen an Tag 5 postoperativ eine ausgeprägte Infiltration mit CD4⁺ und GFP⁺ Zellen. Über den Nachweis des GFP-Signals konnte erstmals eindeutig bewiesen werden, dass NKp46-spezifische NK-Zellen im Balb/c Spenderherz tatsächlich vom Empfängertier stammen.

3.5.1 Während des Abstoßungsprozesses wandern die NK-Zellen der Milz in T-Zellzonen ein

Um Einblicke in die Mechanismen der NK-Zellmobilisierung in der Milz zu gewinnen, wurden Immunofluoreszenzfärbungen auf Milz-Kryoschnitten von naiven und transplantierten NCR1-deletierten und Wildtyp-Tieren angefertigt.

Abbildung 23 zeigt in naiven Milzen NCR1-defizienter Mäuse die Lokalisation von NK-Zellen (GFP), sichtlich abgegrenzt von der T-Zell- (CD4) und B-Zellzone (B220), in der roten Pulpa. CD11c positive Dendritische Zellen konnten hingegen in der weißen Pulpa, der Marginalzone, aber auch in der roten Pulpa der Milz in der Nähe von NK-Zellen nachgewiesen werden. Für Abstoßungsmechanismen scheinen die NK-Zellen die rote Pulpa zu verlassen und in die weiße Pulpa und Marginalzone einzuwandern. Auch die Dendritischen Zellen scheinen sich diffuser im Milzgewebe zu verteilen. Ähnliche Ergebnisse wurden in CD57BL/6 Wildtyp-Rezipienten beobachtet (Daten hier nicht gezeigt). Diese Bilder liefern einen visuellen Beweis, dass die Immunzellen bei Rejektionsvorgängen migrieren können, um miteinander zu interagieren.

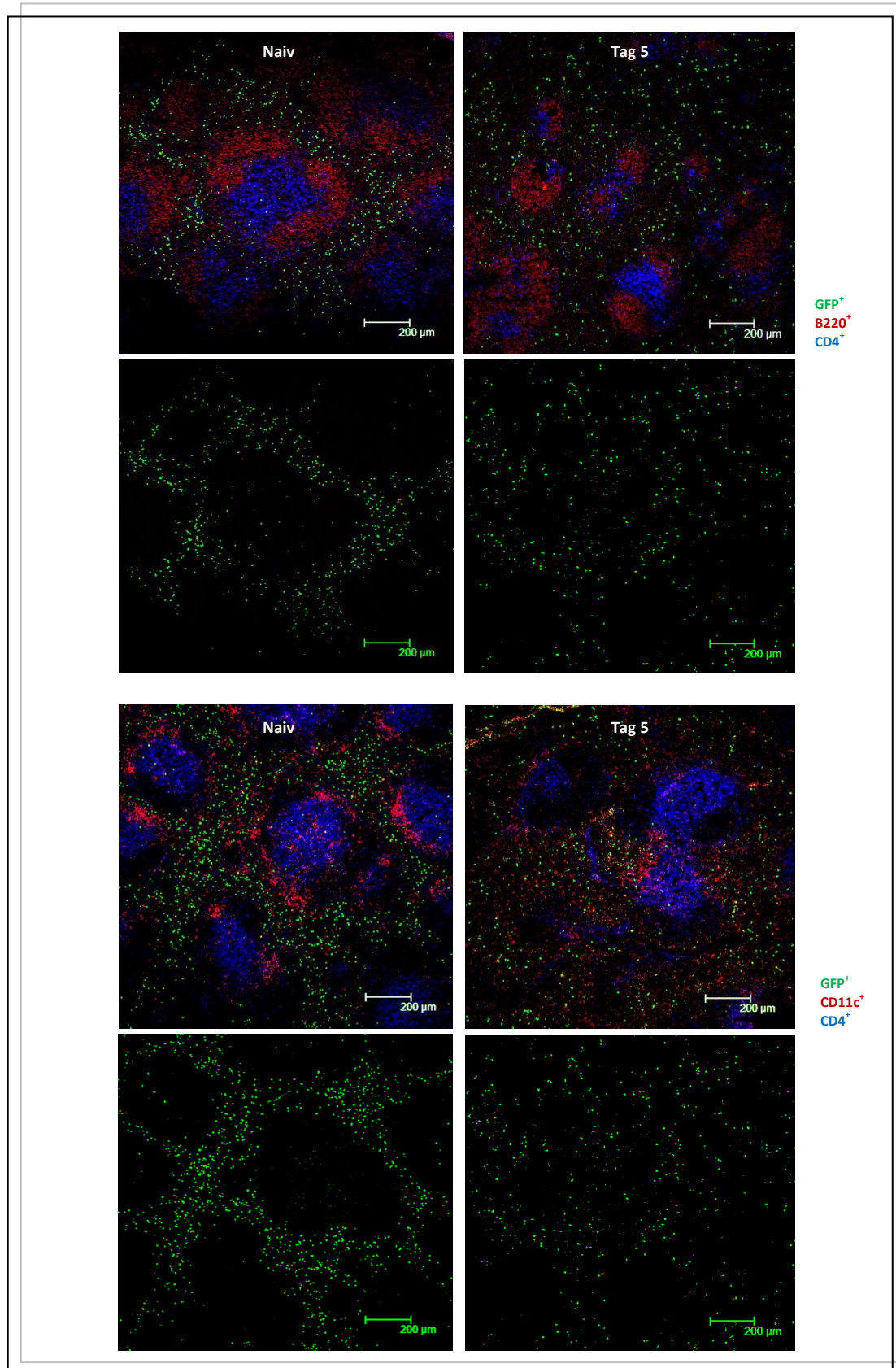


Abb. 23: Lokalisation von Lymphozyten in der Milz von NCR1-defizienten Tieren vor und nach der Transplantation
 Gefrierschnitte von naiven und an Tag 5 nach der Transplantation geernteten $NCR^{GFP/GFP}$ Milzen wurden mit anti-CD4, anti-B220 und anti-CD11c Antikörpern gefärbt. Die Verteilung der Lymphozyten in naiven Tieren wurde mit der Lokalisation nach der Transplantation verglichen. Nach der Transplantation verlassen die NK-Zellen die rote Pulpa und wandern auch in T-Zellzonen ein.

3.6 ZUM ZEITPUNKT DER ABSTOSSUNG ZEIGEN NCR1-DEFIZIENTE ALLOTRANSPLANTATE EIN UNTERSCHIEDLICHES INFILTRATIONSPROFIL ALS WILDTYP-EMPFÄNGER

In der vorliegenden Studie konnte bereits dokumentiert werden, dass sich Wildtyp und NCR1^{GFP/GFP} Mäuse im naiven Zustand in ihrem Rezeptorrepertoire kaum unterscheiden; Allotransplantate in NCR1-defizienten Mäusen jedoch verspätet abgestoßen werden. Die Isolation und durchflusszytometrische Analyse der infiltrierenden Zellen von unbehandelten und mit CTLA-4-Ig behandelten transplantierten Tieren am jeweiligen Tag der Abstoßung (MÜZ 6,86 vs. 13,4 Tage in C57BL/6 Mäusen bzw. 9,0 vs. 16,67 Tage bei NCR1-Defizienz), sollte Aufschluss darüber liefern, welche Zellen für die verzögerte Rejektion verantwortlich sein könnten.

3.6.1 Geringere Infiltrationsraten von NK-Zellen nach Transplantation allogener Herzen in NCR1^{GFP/GFP} Mäuse

Zur Analyse der Verteilung infiltrierender NK-Zellpopulationen wurden die Transplantate der mit CTLA-4-Ig behandelten und unbehandelten C57BL/6- und NCR1^{GFP/GFP} Empfänger am Tag der Abstoßung entnommen und durchflusszytometrisch analysiert.

Interessanterweise ist die Frequenz der NKp46⁺ (bzw. GFP⁺) und NKG2D⁺/NK1.1⁺ NK-Zellen unabhängig von der kostimulatorischen Blockade in allen untersuchten Organen in den NCR1-defizienten Mäusen signifikant dezimiert (s. Abb. 23 A, B und C). Im Allotransplantat der unbehandelten NCR1^{GFP/GFP} Empfänger werden 9 ± 2% NKp46⁺ bzw. 16 ± 2% GFP⁺ Zellen in den Wildtyptieren detektiert. Bei den Wildtyptieren werden im Vergleich zu den NCR1^{GFP/GFP} Tieren sowohl im Transplantat (62 ± 7% vs. 29 ± 7%) als auch in der Milz doppelt so hohe Frequenzen an NKG2D⁺/NK1.1⁺ Lymphozyten gemessen (80 ± 1% vs. 46 ± 3%). Eine Kostimulationsblockade mit CTLA-4-Ig führt in beiden Mäusestämmen im Allotransplantat, in den Milzen und den Lymphknoten zu einer Reduzierung der NKG2D⁺/NK1.1⁺ NK-Zellen. Die Blockierung des CD28 Signals verändert hingegen sowohl in den Wildtyp- als auch den NCR1-defizienten Mäusen die Frequenzen der NKp46⁺ bzw. GFP⁺ Zellen in den allogenen Herzen und den Milzen nur minimal.

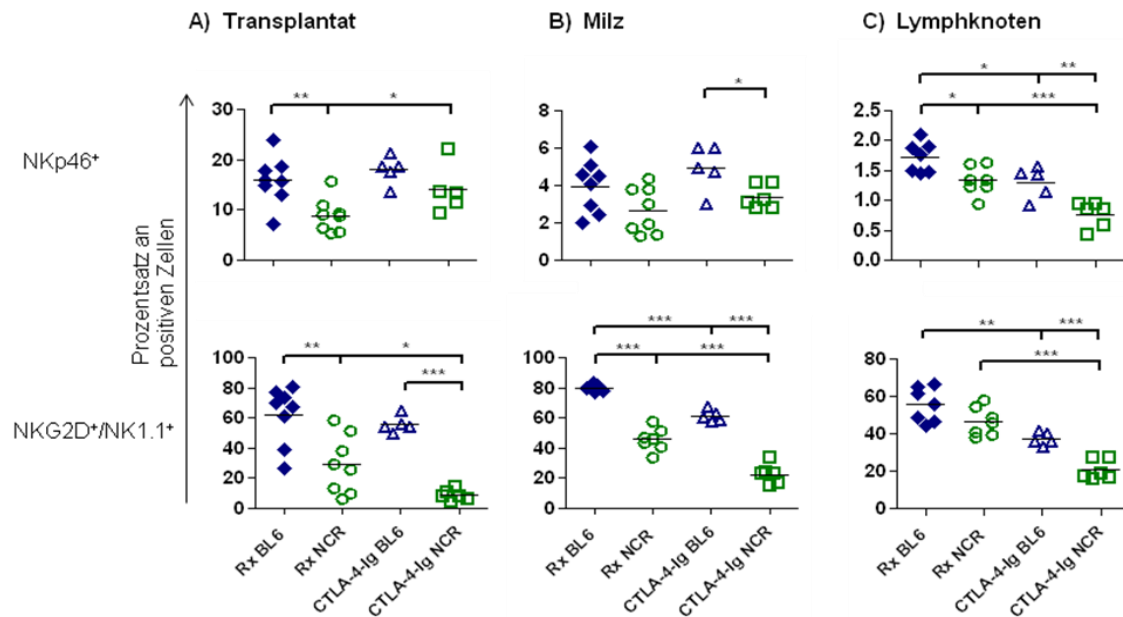


Abb. 23: Vergleich von NK-Zellfrequenzen zwischen C57BL/6 und NCR1^{GFP/GFP} Empfängertiere im Allotransplantat, der Milz und Lymphknoten am Tag der Abstoßung

Unbehandelten bzw. mit CTLA-4-Ig injizierten Wildtyp- und NCR1^{GFP/GFP} Tieren wurden Alloherzen implantiert und die Organe am jeweiligen Tag der Abstoßung entnommen. Die isolierten Lymphozyten wurden mit anti-NKp46 (bzw. GFP -Reporter gen), anti-NKG2D und anti-NK1.1 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die prozentualen Angaben der NKp46⁺ Zellen beziehen sich auf die Gesamtzahl der aufgenommenen Lymphozyten. Die NKG2D⁺ Frequenzen spiegeln den Anteil ihrer Verteilung auf NK1.1⁺ Zellen dar. Die Frequenz der in den Organen nachgewiesenen NK-Zellen ist in NCR1-defizienten Tieren unabhängig von der Kostimulationsblockade reduziert.

T-test: * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.6.2 Eine NCR1-Defizienz führt zur Reduktion der Transplantat-Infiltration von CD4⁺ T-Zellen und zu einer Induktion von CD8⁺ T-Zellen

Die Verteilung Transplantat-infiltrierender T-Zellpopulationen wurde in mit CTLA-4-Ig behandelten und unbehandelten C57BL/6- und NCR1^{GFP/GFP} Empfängern am Tag der Abstoßung durchflusszytometrisch untersucht.

Aus den allotransplantierten Herzen der NCR1-defizienten Mäuse konnten signifikant mehr CD3⁺ T-Zellen isoliert werden als aus der Wildtypkohorte. Eine Blockierung des CD28 Signals durch CTLA-4-Ig reduzierte die Frequenz der infiltrierten T-Zellen in beiden Mäusestämmen. Eine Kostimulationsblockade durch CTLA-4-Ig führte interessanterweise im Wildtyp zu einer Reduktion der CD4⁺ T-Zellen von $23 \pm 3\%$ auf $16 \pm 3\%$, wohingegen die CD8⁺ T-Zellfrequenzen konstant blieben ($38 \pm 4\%$ vs. $34 \pm 4\%$). Im NCR1-Defizienzmodell nahm hingegen der Anteil der CD8⁺ T-Zellen nach CTLA-4-Ig Applikation von $86 \pm 2\%$ auf $47 \pm 7\%$ drastisch ab und die CD4 Frequenz änderte sich kaum (beide $10 \pm 1\%$).

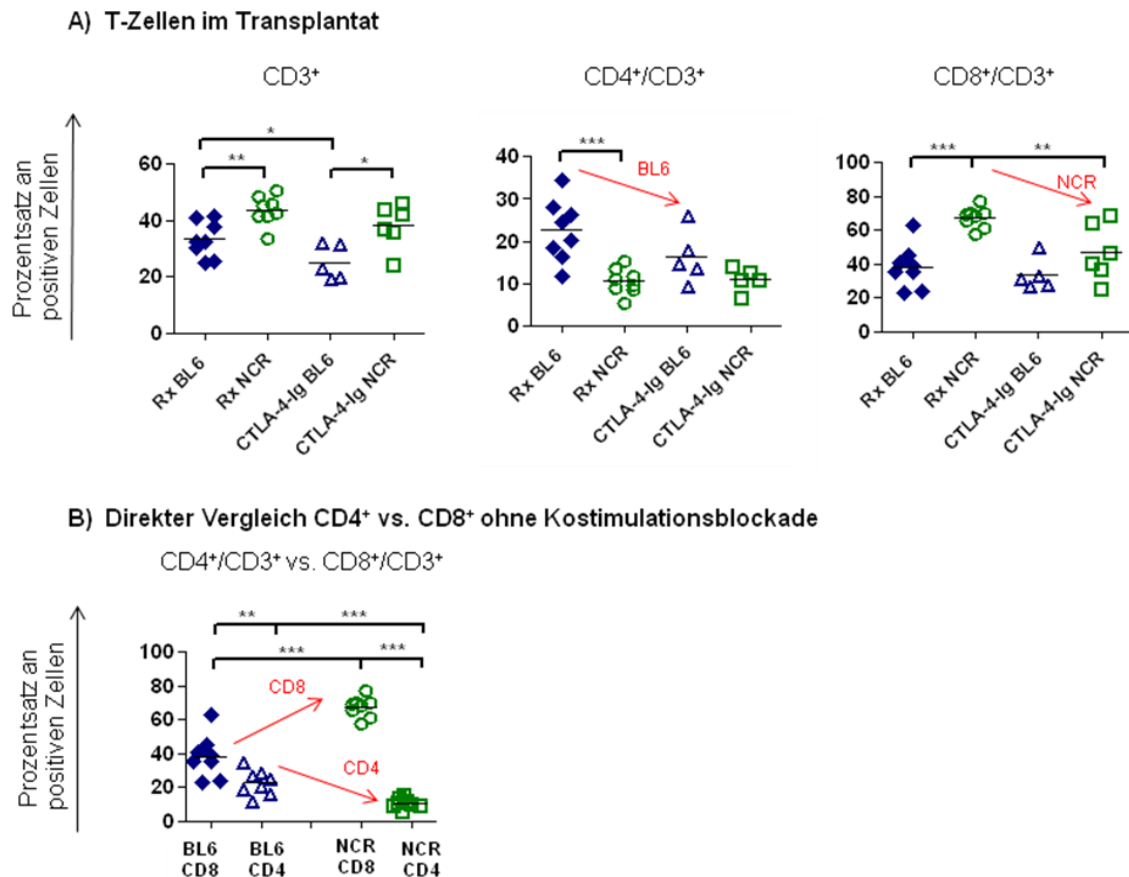


Abb. 24: Vergleich von Zellfrequenzen von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen zwischen C57BL/6 und NCR1^{GFP/GFP} Empfängertieren im Allotransplantat am Tag der Abstoßung

Empfängertiere beider Gruppen erhielten allogene Herzen, wobei eine Gruppe je Mausstamm zusätzlich mit CTLA-4-Ig behandelt wurde. Die aus den Alloherzen isolierten Lymphozyten wurden mit Antikörpern gegen die Oberflächenrezeptoren CD3, CD4 und CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Während eine Kostimulationsblockade mit CTLA-4-Ig in C57BL/6 Tieren zu einer deutlichen Reduktion von CD4⁺ T-Zellen führt, dezimiert in NCR1-defizienten Tieren die Blockierung des CD28-Signals die Frequenzen von CD8⁺ T-Zellen (A). Nach der Transplantation unbehandelter NCR1^{GFP/GFP} Tiere sind die Frequenzen der CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht, wohingegen die CD4 Frequenzen drastisch reduziert sind (B).

T-test: * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

In transplantierten NCR1-defizienten Tieren scheint die Kostimulationsblockade einen Einfluss auf CD8⁺ T-Zellen und in den C57BL/6 Mäusen hingegen auf CD4⁺ T-Zellen zu haben. Weiterhin zeigen die Ergebnisse sowohl im Wildtypmodell als auch bei NCR1-Defizienz eine stärkere CD8⁺ als CD4⁺ T-Zellinfiltration (s. Abb. 24 B). Im Allotransplantat der unbehandelten NCR1^{GFP/GFP} Maus finden sich im Vergleich zum Wildtyp höhere CD8⁺ T-Zellfrequenzen ($68 \pm 2\%$ NCR vs. $38 \pm 4\%$ BL6), wobei der Anteil der CD4⁺ T-Zellen reduziert ist ($23 \pm 2\%$ BL6 vs. $10 \pm 1\%$ NCR). Zum Tag der Abstoßung befinden sich in C57BL/6 Empfängern doppelt so viele CD8⁺ T-Zellen im Transplantat im Vergleich zu CD4⁺ T-Lymphozyten ($38 \pm 4\%$ vs. $23 \pm 2\%$). Bei NCR1-Defizienz entsprachen die aus dem Spenderherzen isolierten CD8⁺ T-Zellen mit $68 \pm 2\%$ vs. $10 \pm 1\%$ sogar der siebenfachen Menge an detektierten CD4⁺ T-Zellen.

3.6.3 Regulatorische T-Zellen sind in NCR1-deletierten Mäusen induziert

Es ist bekannt, dass regulatorische T-Zellen von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Antigentoleranz sind. Dabei scheint der Transkriptionsfaktor FoxP3 eine wichtige Rolle zu spielen. Er wird konstitutiv in CD25⁺CD4⁺ T-Zellen exprimiert und seine Überexpression führt zur Induktion immunsuppressorischer Eigenschaften in konventionellen T-Zellen [Hori *et al.*, 2003].

Um den Einfluss der regulatorischen T-Zellen in unserem Transplantationsmodell zu analysieren, wurden die Lymphozytenpopulationen aus den verschiedenen Organen der transplantierten Tiere entnommen und anhand von spezifischen Markern für Tregs analysiert. Da die Ausbeuten der isolierten Transplantat-infiltrierenden Zellen nach dem Kollagenaseverdau zu gering für eine anschließende intrazelluläre FoxP3 Färbung waren, sollte die Ermittlung der FoxP3 mRNA-Expression Anhaltspunkte für eine Infiltration von Tregs in die allogenen Herzen liefern. Die Menge der mRNA der regulatorischen T-Zellen ist sowohl am Tag 5 nach der Transplantation als auch am Tag der Abstoßung in den NCR1-defizienten Tieren signifikant erhöht (s. Abb 25). Zum Zeitpunkt der Abstoßung sind in den C57BL/6 Wildtypmäusen nur noch minimale mRNA Level zu detektieren, wohingegen der Abfall der Expression in den NCR1^{GFP/GFP} Tieren nicht signifikant ist.

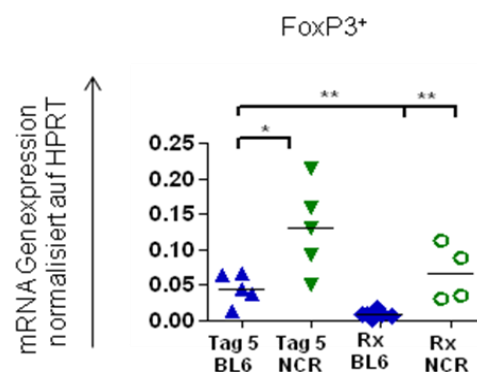


Abb. 25: mRNA-Expression von FoxP3 in den Allotransplantaten von C57BL/6 und NCR1^{GFP/GFP} Empfängertieren

Die allogenen Herzen wurden an Tag 5 nach der Transplantation und am Tag der Abstoßung aus den transplantierten Mäusen entnommen und mittels RT-PCR Analysen untersucht. Die Abwesenheit des NCR1-Gens führt nach der Transplantation zu einer Induktion der FoxP3 mRNA-Expression.

T-test: * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Eine genauere Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen in der Milz und den Lymphknoten konnte durch die durchflusszytometrische Analyse der FoxP3 und CD25 Expression auf CD4⁺ T-Zellen durchgeführt werden. In den Proben der unbehandelten Mäuse wurden bei NCR1-Defizienz in der Milz eine signifikant höhere Frequenz an regulatorischen T-Zellen detektiert ($5 \pm 0,5\%$ vs. $7 \pm 0,7\%$). In den Lymphknoten

NCR^{GFP/GFP} Empfängertiere konnten ebenfalls signifikant mehr CD25⁺FoxP3⁺/CD4⁺ T-Zellen isoliert werden ($4 \pm 0,3\%$ vs. $7 \pm 0,5\%$).

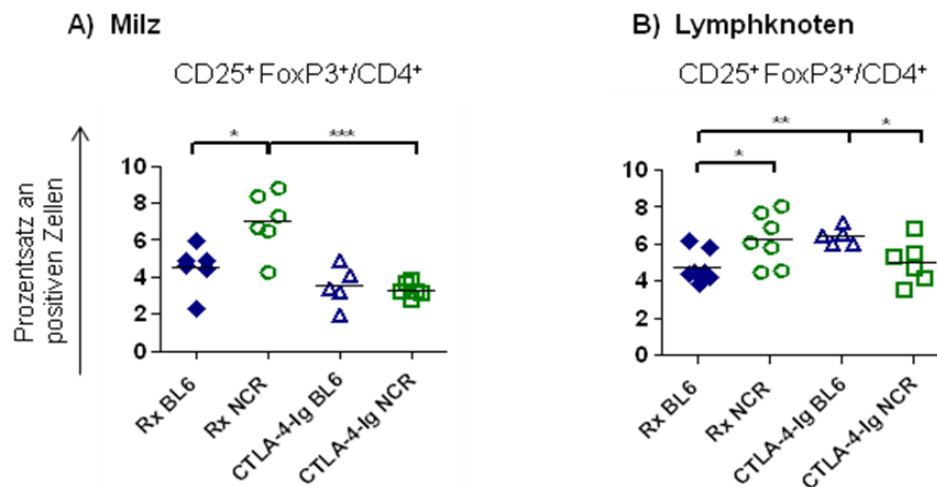


Abb. 26: Zellfrequenzen von Tregs in C57BL/6 und NCR1^{GFP/GFP} Mäusen nach allogener Herztransplantation mit und ohne Kostimulationsblockade

C57BL/6 und NCR1^{GFP/GFP} Tiere wurden in weitere zwei Gruppen unterteilt, wobei je eine Kohorte eine CTLA-4-Ig Applikation erhielt. Die Verteilung der regulatorischen T-Zellen in der Milz und den Lymphknoten wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Frequenzen der CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozyten wurden dabei auf CD4⁺ T-Zellen bezogen. Erfahren NCR1-defiziente Tiere keine Kostimulationsblockade, so werden im Vergleich zur Kontrollgruppe in beiden Organen signifikant höhere prozentuale Anteile an Tregs gemessen. Bei einer Hemmung des CD28 Signalweges sinken die Frequenzen in den Milzen hingegen auf das Niveau der Wildtypiere bzw. in den Lymphknoten unterhalb des Niveaus der Kontrollgruppe. T-test: * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Interessanterweise werden hingegen nach einer kostimulatorischen Blockade mit CTLA-4-Ig in beiden Organen in den NCR1-deletierten Tieren geringere Frequenzen an Tregs nachgewiesen im Vergleich zur Wildtypgruppe. Weiterhin fällt bei den generierten Daten auf, dass die Blockierung des CD28 Signalweges hauptsächlich bei den NCR1^{GFP/GFP} Mäusen in beiden Organen, vor allem aber in der Milz, zu einer dramatischen Reduktion der Tregs führt ($7 \pm 1\%$ vs. $3 \pm 0,2\%$ in der Milz bzw. $7 \pm 0,5\%$ vs. $5 \pm 0,5\%$ in den Lymphknoten).

3.7 VERRINGERTE PRODUKTION INFLAMMATORISCHER ZYTOKINE UND EFFEKTORMOLEKÜLEN IN NCR1^{GFP/GFP} MÄUSEN

Zytokine, zu denen u.a. Interferone, Interleukine und Chemokine gehören, regulieren das Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Ebenso spielen verschiedene Zytokine eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion auf ein Transplantat. Neben der Analyse der an Abstoßungsreaktionen beteiligten Zellpopulationen sollte auch ihr

Aktivierungszustand mittels verschiedener Zytokine und Effktormoleküle bestimmt werden.

3.7.1 Reduzierte Perforin und IFN- γ mRNA-Expressionen in den Organen NCR1-defizienter Empfängertiere

Im Einklang mit der verringerten Infiltration der NK-Zellen und der beobachteten verspäteten Abstoßung der Balb/c Herzen in NCR1-depletierten Mäusen, wurde am Tag der Rejektion im Allotransplantat, in der Milz und in den Lymphknoten eine geringere mRNA-Expression von IFN- γ und Perforin im Vergleich zur Wildtypgruppe detektiert (s. Abb. 27 A, B und C).

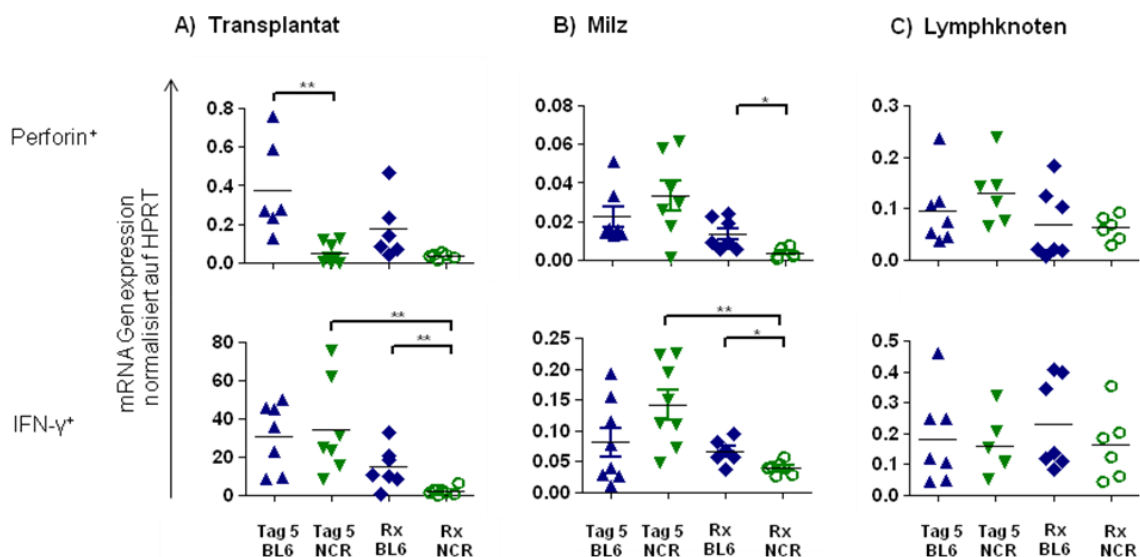


Abb. 27: Vergleich der mRNA-Expression von IFN- γ und Perforin von unbehandelten Wildtyp und NCR1-defizienten Mäusen

Die mRNA-Expression von Perforin- und IFN- γ am Tag 5 nach der Transplantation und am Tag der Abstoßung wurde im Transplantat, in der Milz und in den Lymphknoten mittels RT-PCR Verfahren ermittelt. Am Tag der Abstoßung werden in allen drei untersuchten Organen in NCR1-defizienten Empfängertieren geringerer Perforin- und IFN- γ mRNA-Level detektiert. Zum Tag der Abstoßung sinken im Vergleich zu Tag 5 nach der Herzimplantation in beiden Mäusestämmen die mRNA-Werte für Perforin und IFN- γ . T-test: * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Am Tag 5 nach der Transplantation wurden hingegen vor allem in der Milz zur Kontrollgruppe erhöhte Perforin- und IFN- γ mRNA-Werte gemessen (s. Abb. 27 B). Die kinetische Analyse zeigte insbesondere im Transplantat und in der Milz eine deutliche Abnahme des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ und des Zytotoxizitätsvermittelnden Effktormoleküls Perforin am Tag der Abstoßung im Gegensatz zu Tag 5 post Transplantation.

3.7.2 Im Serum transplantiertter $\text{NCR1}^{\text{GFP/GFP}}$ Mäuse werden reduzierte Konzentrationen an Zytokinen und Effektormolekülen detektiert

An definierten Zeitpunkten (Tag 5 nach Transplantation und am Tag der Abstoßung) wurden Serumproben der Tiere genommen und anhand eines FACS-basierenden zytometrischen Bead assays (CBA) auf IFN- γ und RANTES bzw. mittels ELISA Techniken auf IL-15 und Granzyme B getestet.

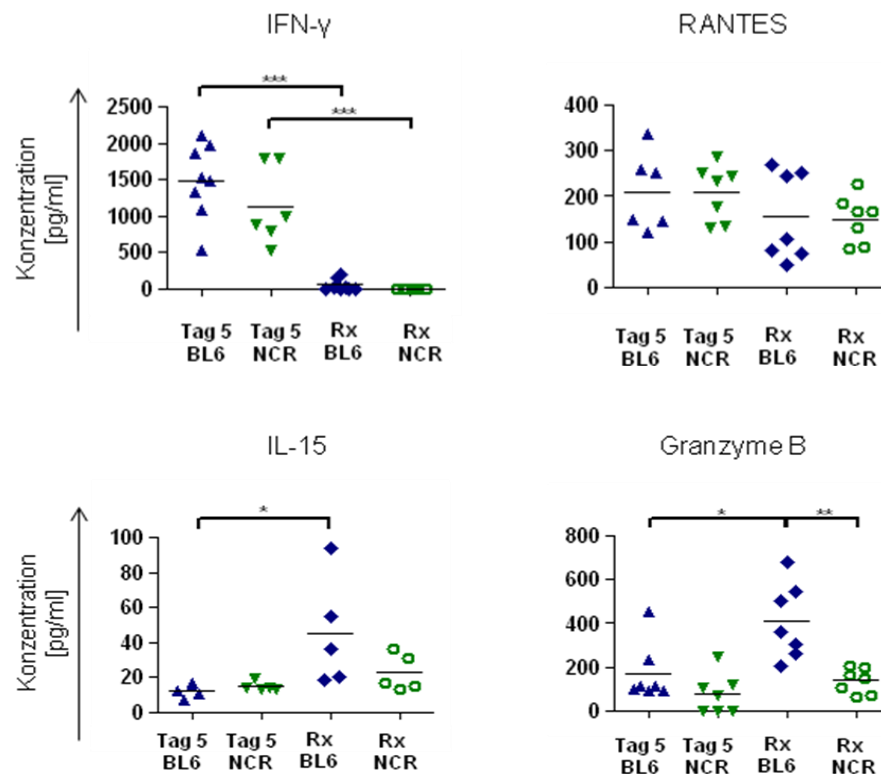


Abb. 28: IFN- γ , RANTES, IL-15 und Granzyme B Konzentrationen aus dem Serum transplantiertter C57BL/6 und $\text{NCR1}^{\text{GFP/GFP}}$ Mäuse

Die IFN- γ und RANTES Konzentration im Serum transplantiertter Tiere wurde mittels CBA assay analysiert. Am Tag 5 nach der Transplantation wurden in beiden Mäusestämmen signifikant höhere Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ detektiert als zum Zeitpunkt der Abstoßung. Weiterhin werden an Tag 5 in $\text{NCR1}^{\text{GFP/GFP}}$ Tieren geringere Mengen an IFN- γ gemessen. Die RANTES Konzentration ist in beiden Mäusestämmen zu beiden Analysezeitpunkten vergleichbar. Zum Tag der Abstoßung sinken die RANTES Level nur minimal.

Die IL-15 und Granzyme B Konzentrationen wurden mittels ELISA Techniken analysiert. Am Tag 5 nach der Transplantation wurden im Serum der beiden Gruppen geringere Konzentrationen von IL-15 und Granzyme B detektiert als zum Zeitpunkt der Abstoßung. In NCR1 -defizienten Tieren wurden an beiden Erntezeitpunkten weniger IL-15 und Granzyme B Werte gemessen. T-test: * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Die vorliegenden Analysen demonstrieren in beiden Tierstämmen am Tag 5 nach der Implantation des allogenen Herzens hohe Konzentrationen von IFN- γ im Serum. In C57BL/6 Tieren wurden $1625 \pm 139,5 \text{ pg/ml}$ und in den $\text{NCR1}^{\text{GFP/GFP}}$ Mäusen $1131 \pm 219 \text{ pg/ml}$ IFN- γ detektiert. Am Tag der Abstoßung hingegen sanken in beiden Gruppen die IFN- γ Konzentrationen auf fast Null (s. Abb. 28). Die RANTES Konzentrationen

unterschieden sich in den beiden Tierstämmen nur minimal ($210 \pm 35\text{pg/ml}$ in BL6 vs. $209 \pm 23\text{pg/ml}$ in NCR). Auch am Tag der Rejektion konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Empfängergruppen detektiert werden. Im Vergleich zu Tag 5 sanken die Werte der C57BL/6 Tiere auf $154 \pm 36\text{pg/ml}$ und der NCR1-defizienten Empfängertiere auf $150 \pm 20\text{pg/ml}$.

Granzyme B (GrB) gehört zu der Familie von neutralen Serin-Proteasen in den zytolytischen Granula von zytotoxischen T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen. Das proinflammatorische Interleukin IL-15 spielt hingegen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung der NK-Zellpopulation. Weiterhin verstärkt es die Zytotoxizität und Zytokinproduktion von NK-Zellen. Zur quantitativen Bestimmung der IL-15 und Granzyme B Konzentration im Serum am Tag 5 und am Tag der Abstoßung wurde ein ELISA Test durchgeführt.

Die IL-15 Konzentrationen am Tag 5 nach der Transplantation befanden sich in beiden Mäusestämmen auf gleichem Niveau. Nach der Abstoßung des Transplantates wurde verglichen zum Tag 5 in C57BL/6 Mäusen signifikant mehr IL-15 detektiert ($12 \pm 2\text{pg/ml}$ vs. $45 \pm 14\text{pg/ml}$). Die IL-15 Konzentration in der NCR^{GFP/GFP} Maus stieg hingegen nicht signifikant an ($15 \pm 1\text{pg/ml}$ vs. $23 \pm 5\text{pg/ml}$). Interessanterweise wurden am Tag der Abstoßung in den NCR1-defizienten Mäusen weniger IL-15 detektiert als in der Kontrollgruppe ($23 \pm 5\text{pg/ml}$ vs. $45 \pm 14\text{pg/ml}$). Auch bei den Granzyme B Konzentrationen stiegen in beiden Gruppen die Werte von Tag 5 bis zum Tag der Abstoßung an. Im Gegensatz zu den NCR1-defizienten Tieren ($78 \pm 34\text{pg/ml}$ vs. $137 \pm 22\text{pg/ml}$) wurde in der Wildtypgruppe eine signifikante Akkumulation detektiert ($170 \pm 52\text{pg/ml}$ vs. $409 \pm 65\text{pg/ml}$). An beiden Zeitpunkten wurde bei NCR1-Defizienz weniger Granzyme B gemessen.

3.8 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Für eine bessere Übersicht werden im Folgenden die generierten Daten dieser Studie zusammengefasst:

Kinetik und Migration

- a) NK-Zellen und APCs infiltrieren massiv in der frühen Phase in das Transplantat und sind zum Tag der Abstoßung nur noch in reduzierter Konzentration messbar. Erhöhte IFN- γ und Perforin Werte im Allotransplantat lassen vermuten, dass die NK-Zellen dort aktiviert sind. T-Zellen scheinen hingegen erst zum Ende des Abstoßungsprozesses in das Allotransplantat rekrutiert zu werden.
- b) NK-Zellen aus der Milz verlassen nach Transplantation die rote Pulpa und wandern in der weißen Pulpa und der Marginalzone in T- und DC-Zellzonen ein

Transplantüberleben

- c) Die Zusammensetzung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen naiver NCR1^{GFP/GFP} Mäuse unterscheidet sich kaum von dem der Wildtypmaus C57BL/6.
- d) Eine NCR1-Deletion verlängert nach allogener, abdominalen heterotoper Herztransplantation das Transplantatüberleben der NCR1^{GFP/GFP} Mäuse um 2 Tage.
- e) Eine Kostimulationsblockade mit CTLA-4-Ig führt beim Wildtyp-Empfänger und bei der NCR1-defizienten Maus zu einer verlängerten Transplantatakzeptanz. Die NCR1^{GFP/GFP} Maus akzeptiert das Allotransplantat trotz Kostimulationsblockade mit vergleichbaren Überlebensraten wie die Wildtypgruppe.

Wildtyp vs. NCR1-Defizienz

- f) Eine NCR1-Defizienz führt zu einer reduzierten Infiltration von NK-Zellen und CD4⁺ T-Zellen bei gleichzeitiger Induktion von CD8⁺ T-Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen.
- g) Eine Blockierung des kostimulatorischen CD28 Signals mithilfe von CTLA-4-Ig führt in beiden Mäusestämmen zu einer Reduktion der meisten untersuchten NK-Zell- und T-Zell-Subpopulationen. Im Wildtyp kommt es zu einer Reduzierung von CD4⁺ T-Zellen, in NCR1-deletierten Mäusen werden CD8⁺ T-Zellen verstärkt gemindert.
- h) Regulatorische T-Zellen werden durch NCR1-Defizienz induziert. NCR1^{GFP/GFP} Mäuse weisen nach Kostimulationsblockade eine wesentlich stärkere Dezimierung von Tregs auf als die Kontrollgruppe.
- i) Das funktionsunfähige NCR1 Gen führt nach Transplantation zu einer verringerten Produktion von Zytokinen und anderen Effektormolekülen.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde ein murines Herztransplantationsmodell zur Untersuchung der Transplantatabstoßung in An- und Abwesenheit des NK-Zell-spezifischen Rezeptors NCR1 in C57BL/6 Mäusen verwendet. Die Wildtypmäuse sind prinzipiell zu einer akuten Abstoßung von allogenen Balb/c Transplantaten in der Lage und bilden daher eine gute Grundlage zur Erforschung der Funktion des NCR1-Rezeptors in Rejektionsmechanismen.

4.1 DIE ROLLE VON NATÜRLICHEN KILLERZELLEN IM MURINEN HERZTRANSPLANTATIONSMODELL

Die Aufgabe von NK-Zellen in Abstoßungsprozessen wird in zahlreichen Studien teilweise widersprüchlich diskutiert und scheint sowohl von der gewählten Mausstamm-Kombination als auch von dem transplantierten Gewebe abhängig zu sein. In der vorliegenden Studie wurde das Herztransplantationsmodell verwendet, da dieses den großen Vorteil aufweist, dass der Zeitpunkt der Abstoßung eindeutig durch das Aussetzen des Schlagimpulses definiert werden kann und über einfache manuelle Palpation detektiert wird. Außerdem befinden sich im Herzmuskelgewebe kaum Lymphozyten, sodass aus dem Transplantat isolierte Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Empfänger stammen. Ferner sind Balb/c und C57BL/6 Mäuse mittlerweile auf Bezug ihres NK-Rezeptorrepertoires die am besten charakterisierten Tiere [Anderson *et al.*, 2005]. Auch ist eine Balb/c Spender- C57BL/6 Empfängerkombination bereits als akutes Abstoßungsmodell etabliert.

Folgende Eigenschaften der NK-Zellen werden für ihren Einfluss auf die Transplantatabstoßung diskutiert: (a) inhibitorische Rezeptoren der NK-Zelle von Rezipienten finden kein Selbst-MHC-Klasse-I-Molekül auf den Donor APCs, sodass keine Hemmung der NK-Zelle stattfinden kann [Ljunggren und Kärre, 1990]; (b) das entzündete Gewebe durch den Ischämie/Reperfusionsschaden reguliert Liganden für aktivierende NK-Zellrezeptoren hoch [Varagunam *et al.*, 2009]; (c) die zytolytische Aktivität von NK-Zellen und die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen können das Transplantatgewebe direkt schädigen. Erst in den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass NK-Zellen aufgrund des Fehlens von Selbst-Liganden für inhibitorische Rezeptoren auf den allogenen Transplantaten angeregt werden und ein aktivierendes Signal an die T-Zellen liefern. Im Folgenden soll ein Überblick über die

durchgeführten Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zur Transplantat-abstoßung in dem gewählten Herztransplantationsmodell gegeben werden, welche in dieser Arbeit diskutiert werden (s. Tabelle).

Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Arbeiten zum allogenen Herztransplantationsmodell

Spender -> Empfänger	Therapie	Applikationsform und Dosis	Transplantat Überleben	Referenz
Balb/c -> BL6			8 ± 1 Tage	Szot <i>et al.</i> , 2001
			7,7 ± 1,2 Tage	Maier <i>et al.</i> , 2001
			7,3 ± 0,5 Tage	Bishop <i>et al.</i> , 2001
			11,5 Tage	Han <i>et al.</i> , 1999
			8 Tage	Ito <i>et al.</i> , 2005
			6,9 ± 0,35 Tage	Eigene Arbeiten
Balb/c -> BL6	+ α-NK1.1	i.v., Tag -2, 1, 3, 5, 9, 13, 17, 21; 200µg	8 ± 0,7 Tage	Maier <i>et al.</i> , 2001
Balb/c -> BL6	+ α-NKG2D	i.p. Tag -1, r.o. 2x die Woche für 4 Wochen; 250µg	Ca. 7 – 8 Tage (wie unbehandelt)	Kim <i>et al.</i> , 2007
Balb/c -> BL6	+ α-NKG2D + CTLA-4-Ig	i.p. Tag -1, r.o. 2x die Woche für 4 Wochen, 250µg i.p. Tag 0, i.v. Tag 3, 7, 10; 200µg	> 74 Tage	Kim <i>et al.</i> , 2007
Balb/c -> NCR1 ^{GFP/GFP}			9 ± 0,53 Tage	Eigene Arbeiten
Balb/c -> NCR1 ^{+ /GFP}			7 ± 0,58 Tage (wie Wildtyp)	Eigene Arbeiten
Balb/c -> IFN-γ ^{-/-} BL6			7,0 ± 0,0 Tage (wie Wildtyp)	Bishop <i>et al.</i> , 2001
Balb/c -> CD28 ^{-/-} BL6			10,7 ± 2,2 Tage	Maier <i>et al.</i> , 2001
			19 ± 1,5 Tage	McNerney <i>et al.</i> , 2006
			16,5 Tage	Ito <i>et al.</i> , 2005
			17 ± 2 Tage	Szot <i>et al.</i> , 2001
Balb/c -> CD28 ^{-/-} BL6	+ α-NK1.1	i.v. Tag -2, 1, 3, 5, 9, 13, 17, 21; 200µg	26,4 ± 6,1 Tage	Maier <i>et al.</i> , 2001
Balb/c -> CD28 ^{-/-} BL6	+ α-NKG2D	i.p. Tag -1, r.o. 2x die Woche für 4 Wochen; 250µg	70,1 Tage	Kim <i>et al.</i> , 2007
	+ α-NKG2D	i.p. Tag -1, 0, 4; 133µg	Ca. 17 Tage (wie unbehandelt)	McNerney <i>et al.</i> , 2006
Balb/c -> CD28 ^{-/-} BL6	+ α- Ly49G2 + α- Ly49C/I	i.p. -2, 1; 150µl Ascitis i.p. -2, 1; 100µl Ascitis	13 ± 0,5 Tage	McNerney <i>et al.</i> , 2006
Balb/c -> CD28 ^{-/-} BL6	+ α- Ly49 D/A	i.p. -2, 1; 200µg	Ca. 19 Tage (wie unbehandelt)	McNerney <i>et al.</i> , 2006

Bei der Depletion Natürlicher Killerzellen durch Administration eines polyklonalen Kaninchen-Serums (Asialo-GM1-Antiserum) beobachteten Heidecke *et al.* in einem heterotopen Herztransplantationsmodell in der Ratte eine nur unwesentliche Verlängerung des Transplantatüberlebens und folgerten zunächst daraus, dass NK-Zellen keine entscheidende Rolle in der Abstoßung von Herztransplantaten spielen [Heidecke *et al.*, 1985]. Auch zeigten spätere Arbeiten an Mäusen im Balb/c Spender und C57BL/6 Empfängertiermodell, dass eine Deletion von NK-Zellen durch anti-NK1.1 bzw. anti-NKG2D Antikörper keinen Einfluss auf die Abstoßung von allogenen Herztransplantaten hatte [Maier *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007]. Die Arbeit von Maier *et al.* konnte jedoch bei einer NK1.1-Blockade mit gleichzeitiger Inhibition der CD28-Kostimulation tatsächlich eine signifikant verlängerte Toleranz der Herzen im Vergleich zu Tieren ohne NK1.1-Depletion zeigen [Maier *et al.*, 2001]. Weiterhin führte eine Blockade durch Antikörper, welche spezifisch für die inhibierenden NK-Zellrezeptoren Ly49G/C/I sind, unter CD28 Defizienz sogar zu einer verfrühten Transplantatabstoßung im Vergleich zu unbehandelten CD28^{-/-} Mäusen [McNerney *et al.*, 2007]. Auch die Blockierung mit anti-NKG2D Antikörpern konnte unter Kostimulationsblockade in CD28^{-/-} Tieren bzw. unter Hemmung des CD28 Signalweges durch CTLA-4-Ig zu einer verlängerten Transplantatakzeptanz führen [McNerney *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007]. Es fällt allerdings auf, dass die Behandlung mit blockierenden Antikörpern zeit- und dosisabhängig zu sein scheint, da McNerney *et al.* unter Verwendung eines anderen Depletionsprotokolls von NKG2D bei geringerer Dosis und in einem kürzeren Zeitraum in den CD28-defizienten Tieren im Gegensatz zu Kim *et al.* kein verlängertes Transplantatüberleben beobachten konnte. In der vorliegenden Studie stand uns mit der transgenen NCR1^{GFP/GFP} Maus durch die genetisch verankerte Deletion des NK-Zell-spezifischen NCR1 (NKp46) Rezeptors ein von der Applikationsform unabhängiges NCR1-Defizienz Modell zur Verfügung. Ferner ist bekannt, dass die bisherigen Ziel-Rezeptoren, wie NK1.1 oder NKG2D auch auf anderen Lymphozyten exprimiert werden. NKp46 ist hingegen bis zum heutigen Stand der Forschung der einzige Rezeptor, der spezifisch auf NK-Zellen aufzufinden ist. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass allein die Abwesenheit eines NK-Zellrezeptors (keine vollständige NK-Zelldepletion) auch ohne zusätzliche Kostimulationsblockade zu einer verzögerten Rejektion allogener Herztransplantate führt (s. Kapitel 3.3).

4.1.1 Die kinetische Regulation des Trafficking von Lymphozyten in Abstoßungsprozessen

Da die Rejektionsmechanismen dynamischen Prozessen unterliegen, ist es wichtig, die Kinetik der molekularen Vorgänge genau zu kennen, um gezielt den Zeitpunkt zum

Beginn einer Therapie zu definieren und die Immunsuppression mit der Zeit systematisch zu adaptieren.

Im Gegensatz zu den meisten experimentellen Studien, welche die Infiltrationsraten in die Transplantate an nur einem definierten Zeitpunkt (meist am Tag der Abstoßung) betrachtet haben, sollte in dieser Studie der kinetische Verlauf der Transplantat-infiltration untersucht werden und ob die Milz und die Lymphknoten an den Rejektionsvorgängen beteiligt sind. Zelluläre Infiltrate sind ein Charakteristikum der akuten Abstoßung allogener Transplantate [Medawar, 1944; Tilney *et al.*, 1975; Mason und Morris, 1986]. In einem Lebertransplantationsmodell an Ratten konnten Obara *et al.* anhand kinetischer Analysen nachweisen, dass bereits nach 6 Stunden über 50% der aus den Lebertransplantaten isolierten NK-Zellen vom Rezipienten stammen. Die Frequenz der Empfänger NK-Zellen erreichte ihren Peak 12 Stunden nach der Transplantation, sank bis zum Tag 3 und stieg über Tag 5 und Tag der Abstoßung wieder leicht an [Obara *et al.*, 2005]. Die Immunfluoreszenzdaten aus Kapitel 3.5 der vorliegenden Arbeit zeigen in dem akuten Abstoßungsmodell an Tag 1 in Herztransplantaten keine zellulären Infiltrate und auch an Tag 3 konnten in den Organen nur minimale Mengen an mRNA der verschiedenen Lymphozytenpopulationen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für die kinetischen Analysen die Lymphozytenkomposition an Tag 5 und am Tag der Abstoßung verglichen. Wie in Kapitel 3.1 gezeigt, bestätigen die Ergebnisse dieser Studie, dass NK-Zellen und Dendritische Zellen früher als CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in das Transplantat infiltrieren [Baldwin *et al.*, 2001]. Korrespondierend zur Kinetik der NK-Zellinfiltration wurden auch für das proinflammatorische Zytokin IFN- γ und das Chemokin RANTES hohe Werte an Tag 5 und abnehmende Level hin zum Tag der Abstoßung im Serum beobachtet, wobei RANTES auch zum Tag der Abstoßung in hohen Konzentrationen detektierbar ist (s. Kapitel 3.7.2). Es konnte bereits gezeigt werden, dass NK-Zellen über eine Stimulation durch RANTES in verschiedene Organe und Blutgefäße migrieren können. So wurden aus der Milz isolierte, gelabelte NK-Zellen nach einem adoptiven Transfer in der Milz, in der Leber und im Knochenmark der behandelten Tiere wiedergefunden [Prlic *et al.*, 2003]. Wir nehmen an, dass die Fähigkeit der NK-Zellen antigenunspezifisch aktiviert zu werden, sie früher als T-Zellen für Migrationssignale empfänglicher macht und diese daher als erste in das Transplantat einwandern. In der Literatur wird RANTES (CCL5) als potentieller Faktor für die Entstehung einer Abstoßungsreaktion diskutiert, da es als mRNA und Protein während der akuten Transplantatabstoßung in hohen Konzentrationen nachweisbar ist [Pattison *et al.*, 1994; Nadeau *et al.*, 1995; Nagano *et al.*, 1997]. Es ist bekannt, dass sich das Endothel in der frühen Phase der Rejektion entzündet und die degranulierten Thrombozyten RANTES sezernieren, welches an der Endotheloberfläche bindet. Das akkumulierte, an

der Oberfläche bindende Chemokin sendet den zirkulierenden Lymphozyten direktionale Signale, während sie am Endothel „entlang rollen“ [Butcher 1991; Springer 1994; Butcher und Picker 1996]. Die Chemokinrezeptoren der Leukozyten erkennen das oberflächengebundene Protein und steigern die Integrin-Produktion. Daraufhin gehen sie eine feste Adhäsion mit der endothelialen Oberfläche ein und durchlaufen die Extravasation.

Weiterhin konnten Experimente zeigen, dass die Zunahme von NK-Zellen bei der Inflammation in der Leber mit der Abnahme der NK-Zellen in der Milz und Knochenmark korrelierte und zur Hypothese führte, dass die Milz und das Knochenmark als „Reservoir“ für NK-Zellen bei Entzündungsprozessen dient [Wald *et al.*, 2006]. Die Daten aus Kapitel 3.1 der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass die in das Transplantat eingewanderten NK-Zellen aus der Milz bzw. Lymphknoten stammen könnten, da die Kurven in diesen Organen reziprok zur Kurve der Transplantat-infiltrierenden NK-Zellen verlaufen. Zur Bestätigung dieser Hypothese könnten in folgenden Experimenten markierte NK-Zellen adoptiv in die Milz des Empfängertiers transferiert werden. Können diese NK-Zellen nach der Transplantation im Spenderherzen detektiert werden, wäre dies ein eindeutiger Beweis für die Migration von NK-Zellen aus der Milz des Empfängertiers in das Transplantat.

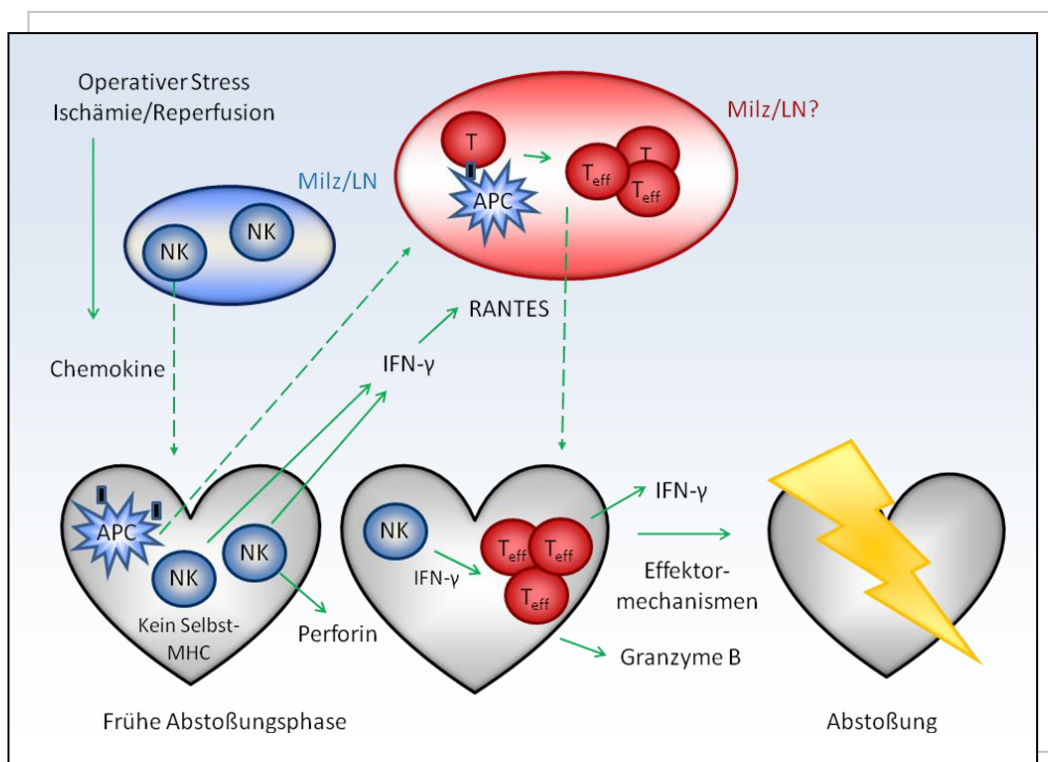


Abb. 29: Schematische Darstellung der möglichen Mechanismen einer Transplantatabstoßung

- Aktivierung von Lymphozyten bzw. Produktion von Effektormolekülen
- Wanderung von Lymphozyten zwischen verschiedenen Organen
- Donor-Antigene

Die kinetischen Daten aus Kapitel 3.1 zusammenfassend, wird in dieser Arbeit folgende Hypothese für die Mechanismen der Transplantatabstoßung allogener Herzen aufgestellt (s. Abb. 29). Der Stress während der Transplantation und die Ischämie/Reperfusionsschäden führen zu einer erhöhten Chemokinproduktion (z.B. RANTES). Diese Chemokinausschüttung veranlasst NK-Zellen und Dendritische Zellen aus der Milz in das Transplantat zu infiltrieren. Die DCs nehmen die Antigene des Spenderherzens auf, prozessieren sie und wandern z.B. in die Lymphknoten und präsentieren diese an die T-Zellen. Die NK-Zellen des Empfängers erkennen im Allotransplantat die Abwesenheit der Selbst MHC-Klasse-I-Moleküle und produzieren nach der Aktivierung vermehrt IFN- γ , welches eine weitere Induktion von RANTES bewirkt [Marfaing-Koka *et al.*, 1995; Obara *et al.*, 2005]. Dieses rekrutiert wiederum die Effektor-T-Zellen in die allogenen Herzen. RANTES gilt dabei als das potenteste Chemokin in der Rekrutierung von zytotoxischen T-Zellen [Melter *et al.*, 1999]. Die aktivierten T- und NK-Zellen führen durch ihre Effektormechanismen zur Schädigung des Transplantates (s. Kapitel 1.1.2.1).

In Übereinstimmung mit vorherigen Studien [Maier *et al.*, 2001; McNerney *et al.*, 2005] unterstützen auch die Daten der vorliegenden Arbeit die These, dass NK-Zellen über Zytokine wie z.B. IFN- γ als Vermittler zwischen angeborener und erworbener Immunität dienen könnten und somit indirekt einen entscheidenden Einfluss auf Abstoßungsprozesse üben. Die möglichen zellulären Mechanismen der NK-Zellfunktion bei der Rejektion werden im zweiten Teil der Arbeit unter Verwendung einer NCR1-defizienten transgenen Maus diskutiert (s. Kapitel 4.2).

4.1.2 NK-Zelltrafficking innerhalb der peripheren lymphatischen Organe

Beuneu *et al.* beschrieben das dynamische Verhalten der NK-Zellen in Lymphknoten [Beuneu *et al.*, 2009]. Anhand einer generierten Reporterm Maus, deren NK-Zellen mit GFP und die Dendritischen Zellen mittels YFP-Signal detektiert werden konnten, wurde das Verhalten von ruhenden mit aktivierten NK-Zellen verglichen. In der ruhenden Phase befanden sich NK-Zellen in der peripheren T-Zellzone und bewegten sich mit 9,4 μ m/min nur ein wenig langsamer als T-Zellen. Weiterhin wurden nur kurzzeitige Kontakte zwischen DCs und NK-Zellen (< 5min) beobachtet. Nach der *in vivo* Stimulierung mit Poly I:C, dem synthetischen Analog von dsRNA, erreichten die NK-Zellen nach 24 Stunden ihre maximale Geschwindigkeit von 11,4 μ m/min und wurden auch in der T-Zellzone nachgewiesen. Aber auch im aktivierten Zustand bildeten DCs und NK-Zellen nur kurze Zell-Zellkontakte (1 – 3min) aus. Im Gegensatz dazu bildeten sowohl CD4 als auch CD8 positive T-Zellen stabile Verbindungen mit den DCs aus. Gregoire *et al.* untersuchten hingegen das Migrationsverhalten von NK-Zellen

in der Milz. Im Ruhezustand wurden die NK-Zellen in der roten Pulpa, sichtbar von der T- und B-Zellzone abgegrenzt, lokalisiert. Nach *in vivo* Behandlung mit ConA sammelten sich die NK-Zellen nach 8 Stunden an der Marginalzone der Milz und waren nach 48 Stunden in verringerter Anzahl wieder in der weißen Pulpa detektierbar [Gregoire *et al.*, 2007]. Die Immunfluoreszenzdaten aus Kapitel 3.5.1 der vorliegenden Studie zeigen erstmalig das Migrationsverhalten von NK-Zellen in der Milz während des Abstoßungsmechanismus. Es konnte demonstriert werden, dass an Tag 5 nach der Transplantation die aktivierten NK-Zellen aus der weißen Pulpa in die T-Zellzone und Marginalzone einwandern. Es wird vermutet, dass diese dort mit den DCs kurzzeitige Zell-Zellinteraktionen eingehen und T-Zellen aktivieren könnten. An Tag 1 und Tag 2 nach der Transplantation konnten in den geernteten Milzen nur sehr wenige NK-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt); ein weiteres Indiz, dass die NK-Zellen aus der Milz in der frühen Phase der Abstoßung in das Transplantat infiltrieren. Eine ringförmige Ansammlung der NK-Zellen an die Marginalzone wie in der Arbeit von Gregoire *et al.* konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig dokumentiert werden. Möglicherweise könnte eine engmaschigere Kinetik dieses Phänomen sichtbar machen, da die ringförmige Relokalisation der NK-Zellen um die Marginalzone ein transienter Vorgang zu sein scheint.

4.2 EINE NCR1-DEFIZIENZ MODULIERT DIE IMMUNANTWORT BEI ABSTOßUNGSREAKTIONEN

Im zweiten Teil der Arbeit sollte anhand einer transgenen Maus, die durch die Abwesenheit des NK-Zell-spezifischen Rezeptors NCR1 charakterisiert ist, die Funktion des Rezeptors und der NK-Zellen in der Transplantatabstoßung genauer untersucht werden. In vorangegangenen Studien wurde die Rolle der NK-Zelle bei der Rejektion allogener solider Transplantate mit blockierenden Antikörpern gegen verschiedene NK-Rezeptoren durchgeführt (s. Tabelle in Kapitel 4.1). Wie schon in Kapitel 4.1 aufgezeigt werden konnte, ist der Erfolg der Inhibierung oftmals dosis- und zeitabhängig und muss in aufwändigen Schritten verifiziert werden. Mit der NCR^{GFP/GFP} Maus [Gazit *et al.*, 2006] stand in dieser Studie ein Modell zur Verfügung, in welchem nicht nur das NK-Zell-spezifische NCR1 Gen genetisch ausgeschaltet ist, sondern auch durch Einführen des Reportergens GFP die NK-Zellen eindeutig nachgewiesen werden können.

4.2.1 Auswirkungen der NCR1-Defizienz auf NK-Zellen

NCR1-defiziente Mäuse zeigen unter normalen Bedingungen weder einen auffälligen Phänotyp, noch T-Zelldefizienzen oder veränderte Aktivierungsstadien der Lymphozyten [Gazit *et al.*, 2006]. Die Funktion des nicht-MHC-Klasse-I abhängigen NCR1 Rezeptors wurde bisher nur in Tumor- und Infektionsstudien veröffentlicht. So sterben mit Influenzaviren infizierte Mäuse, denen der aktivierende zytotoxische Rezeptor NCR1 fehlt. Ebenso wurde im Gegensatz zu den Wildtyptieren ein unkontrollierbares Wachstum von Lymphoma und Meloma Tumoren in den NCR1^{GFP/GFP} Mäusen beobachtet [Halfteck *et al.*, 2009; Lakshmikanth *et al.*, 2009]. Die gleichen Eigenschaften des NCR1 Rezeptors, die in Infektions- und Tumorstudien „positiv regulierend“ für die Bekämpfung der Viren und Tumore wirken, könnten die Akzeptanz der Spenderherzen im Transplantationsmodell „negativ“ modulieren. Tatsächlich wurde in den vorliegenden Untersuchungen eine verzögerte Abstoßung der allogenen Herzen in NCR1-deletierten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (s. Kapitel 3.3). Werden hingegen heterozygote Empfängertiere mit den allogenen Herzen transplantiert, so stoßen diese mit den für die Wildtyptiere charakteristischen mittleren Überlebenszeiten ab. Anhand eines „lung tumor clearance assay“, bei dem fluoreszenzgelabelte Tumorzellen in die Maus injiziert und die Anzahl der noch nicht durch NK-Zellen lysierten Zellen nach definierten Zeitpunkten aus der Lunge isoliert und durchflusszytometrisch analysiert werden [Oberberg *et al.*, 2004], können die zytotoxischen Eigenschaften von NK-Zellen *in vivo* bestimmt werden. In verschiedenen Studien konnte demonstriert werden, dass eine NCR1-Defizienz die zytolytische Aktivität der NK-Zelle *in vivo* mindert [Gazit *et al.*, 2006; Halfteck *et al.*, 2009]. In der vorliegenden Arbeit konnten an *ex vivo* isolierten, mit IL-2 stimulierten NK-Zellen aus naiven und transplantierten Tieren von Wildtyp bzw. NCR1^{GFP/GFP} Empfängern, die mit allogenen Targetzellen inkubiert wurden, nachgewiesen werden, dass eine NCR1-Defizienz in naiven Tieren die Zytotoxizität der NK-Zellen deutlich vermindert. Wir postulieren, dass das bereits beschriebene Phänomen, dass die Dichte der NKp46-Expression auf der Zelloberfläche mit der Zytotoxizität der NK-Zellen korreliert [Ishigami *et al.*, 2000], eine Erklärung für diese Beobachtung liefert. Im Einklang mit den Daten aus dem Infektionsmodell von Gazit *et al.* postulieren wir, dass während der Transplantatabstoßung die Immunantworten so moduliert werden, dass andere NK-Zellrezeptoren wie z.B. NKG2D die zytolytische Aufgabe des NCR1 Rezeptors übernehmen können, da die NK-Zellen aus transplantierten NCR1-defizienten Tieren eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Aktivität zeigten. Nach einer Influenzainfektion wandern NK-Zellen in der frühen Phase vom Blut in die Lunge. Mit zunehmender Infektion erreichen die NK-Zellen im Blut wieder ihre Ausgangskonzentration bei weiter ansteigenden Werten in der Lunge. Im

Knochenmark und in der Milz steigen die Frequenzen über den gesamten Infektionszeitraum über an [Gazit *et al.*, 2009]. Auffällig ist, dass eine NCR1-Defizienz keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der NK-Zellen zu haben scheint, da auch in den Tumorstudien die NCR1-deletierten Mäuse eine zu den Wildtyptieren vergleichbare Infiltrationsfrequenz der NK-Zellen aufweisen [Halfteck *et al.*, 2009]. Wie in Kapitel 3.6.1 gezeigt, wurde hingegen in der vorliegenden Transplantationsstudie in der NCR1^{GFP/GFP} Gruppe eine drastisch reduzierte NK-Zellfrequenz im Transplantat, in der Milz und den Lymphknoten beobachtet. Die verminderten NK-Zellfrequenzen in den NCR^{GFP/GFP} Tieren gingen mit reduzierten Konzentrationen von Effektormolekülen wie Perforin und Granzyme B oder Chemokinen bzw. Zytokinen wie RANTES oder IFN- γ im Transplantat und Blut einher (s. Kapitel 3.7.1 und 3.7.2). Diese Daten mit den Ergebnissen der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen aus Kapitel 3.4 zusammenfassend, wird folgende Hypothese aufgestellt: Da die Deletion des zytotoxischen NCR1 Rezeptors zu einer verminderten Zytotoxizität von naiven NK-Zellen führt, werden im Vergleich zur Wildtypgruppe in der unmittelbaren post Transplantationsphase weniger NK-Zellen aktiviert, in den Milzen und Lymphknoten zu proliferieren bzw. in das Spenderherz zu infiltrieren. Da sich die zytolytische Aktivität der beiden untersuchten Empfängerstämme aber im Verlaufe des Abstoßungsprozesses angleicht, könnte wie Gazit *et al.* bereits vorgeschlagen haben, der u.a. auch auf NK-Zellen exprimierte NKG2D Rezeptor in NCR1^{GFP/GFP} Tieren für die Zytotoxizität verantwortlich sein.

4.2.2 Eine NCR1-Defizienz moduliert die T-Zellantwort zugunsten von CD8⁺ Zellen

Die Relevanz von T-Zellen in der Rejektionsphase von allogenen Transplantaten wurde bereits anhand von T-Zell-defizienten Mäusen und blockierenden Antikörpern diskutiert [Shelton *et al.*, 1992]. Die relative Bedeutung von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen scheint dabei von dem jeweiligen Transplantationsmodell abhängig zu sein. So sind sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen ausreichend, um Dünndarmtransplantate abzustößen [Newell *et al.*, 1997]. Hauttransplantate konnten durch CD8⁺ T-Zellen, aber nicht CD4⁺ Lymphozyten allein effektiv rejiziert werden [Trambley *et al.*, 1999; Krieger *et al.*, 1996]. Hingegen scheinen CD8⁺ T-Zellen bei Lebertransplantationen für die Abstoßung keine Rolle zu spielen [Ogura *et al.*, 2001].

Nach allogenen Herztransplantationen in Mäusen beobachteten verschiedene Gruppen, dass CD4⁺ T-Zellen notwendig und hinreichend zur Rejektion der Herzen sind [Krieger *et al.*, 1996; Campos *et al.*, 1995; Mottram *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2005]. Diese

Beobachtungen führten zu der Überzeugung, dass $CD8^+$ T-Zellen für eine Abstoßungsreaktion von kardialen Transplantaten keine Rolle spielen. Eigene Arbeiten (s. Kapitel 3.6.2) zeigten im Einklang mit anderen Studien im Wildtypmodell jedoch eine 2 – 5 fach höhere Infiltration von $CD8^+$ T-Zellen im Vergleich zu $CD4^+$ Zellen [Stinn *et al.*, 1998; Szot *et al.*, 2001], sodass vermutet wird, dass $CD8^+$ T-Zellen bei der Abstoßung allogener Herzen doch von Bedeutung sein könnten. Interessanterweise deuten Experimente darauf hin, dass durch eine Kostimulationsblockade über eine CD28-Deletion die Rejektion auch von Herztransplantaten CD8 abhängig wird. So werden Balb/c Herzen in $CD28^{-/-}$ C57BL/6 Mäusen bei Applikation eines anti-CD8 Antikörpers bzw. bei Deletion des CD8 Gens im Gegensatz zu Wildtypempfängern toleriert [Szot *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2005]. Ferner wurde in dem Transplantationsmodell mit Kostimulationsblockade bei den Infiltrationsraten gezeigt, dass das CD8/CD4 Verhältnis der in die Allotransplantate infiltrierenden T-Zellen in Richtung der $CD8^+$ T-Zellen verschoben wurde. Interessanterweise wurden im selben Modell bei zusätzlicher NK1.1 Depletion in den $CD28^{-/-}$ Mäusen kaum noch messbare infiltrierende $CD4^+$ T-Zellen detektiert. Maier *et al.* begründeten die verminderte Infiltration von $CD4^+$ T-Zellen in den CD28-defizienten Tieren damit, dass $CD4^+$ T-Zellen stärker von der Kostimulation abhängig sein könnten als $CD8^+$ T-Zellen, da dieses bereits für Dünndarm- und Hauttransplantationsmodelle gezeigt wurde [Honey *et al.*, 1999; Newell *et al.*, 1999]. Mögliche Gründe, warum eine zusätzliche NK1.1 Deletion eine CD4 Infiltration verhindert, wurden nicht diskutiert. Eine Modulation der T-Zellantworten scheint jedoch kein ungewöhnliches Phänomen zu sein, denn eine CD8 abhängige Rejektion von allogenen Herztransplantaten konnte auch in IFN- γ -defizienten Mäusen beobachtet werden [Bishop *et al.*, 2001]. Wurden IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäuse mit CD4 und CD8 maskierenden Antikörpern behandelt, stießen die IFN- γ -defizienten Mäuse mit anti-CD4 Applikation wesentlich früher als die Wildtypgruppe ab. Eine CD8 Blockade führte in den IFN- γ -defizienten Tieren im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen zu einer verzögerten Abstoßung. Weiterhin wurden in der Gruppe der mit anti-CD4 behandelten IFN- $\gamma^{-/-}$ Empfänger sowohl in der Milz als auch im allogenen Spenderherz erhöhte Frequenzen von aktivierten $CD8^+$ T-Zellen ($CD45RB^{low}$) nachgewiesen; ein Hinweis, dass bei der Abwesenheit von IFN- γ $CD8^+$ T-Lymphozyten unabhängig von $CD4^+$ T-Zellantworten direkt an dem Rejektionsmechanismus beteiligt sind. Die Autoren konnten keine schlüssige These aufstellen, welche Mechanismen für diese Verschiebung der T-Zellantwort verantwortlich sein könnten. Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von IFN- γ eine CD8 T-Zell-abhängige Abstoßung unterdrücken könnte. Weiterführende Untersuchungen im Wildtypmodell zeigten eine mögliche Relevanz der $CD8^+$ T-Zellen in der Transplantation auf. Wurden $CD4^+$ T-Zellen bereits 2 Tage vor der Transplantation blockiert, führte dieses zu einer Transplantattoleranz. Fand die

Blockierung jedoch erst 4 Tage nach der Transplantation statt, stießen die Herzen bereits an Tag 11 ab. Erstaunlicherweise konnte bei später CD4⁺ T-Zellblockierung eine zusätzliche CD8-Maskierung pre- und post Transplantation noch eine Akzeptanz des Allotransplantates herbeiführen [Szot *et al.*, 2001]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Transplantatabstoßung bei Wildtyptieren in der frühen Anfangsphase CD4 abhängig ist, doch kann eine Unterdrückung der CD4-Antwort (z.B. durch Immunsuppression) zu einer Verschiebung in Richtung einer CD8 vermittelten T-Zellantwort führen.

Die vorliegende Arbeit zeigt sowohl im Wildtyp als auch im NCR1-Defizienzmodell eine stärkere Infiltration von CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺ T-Lymphozyten in das Spenderherz (s. Kapitel 3.6.2). Das Fehlen des NCR1 Gens führte vergleichbar mit den Ergebnissen der CD28 Kostimulationsblockade [Maier *et al.*, 2001] zu einer reduzierten Infiltration von CD4⁺ T-Zellen und einer massiven Akkumulation der CD8⁺ T-Lymphozyten. Die Daten aus den vorliegenden Experimenten weisen somit darauf hin, dass bei der Transplantatabstoßung allogener Herzen eine NCR1-Defizienz ebenfalls zu einer Verschiebung der T-Zellantwort in Richtung der CD8⁺ T-Zellen führt. Einen eindeutigen Beweis für diese Theorie könnte in dieser Studie eine zusätzliche Blockade mit anti-CD8 Antikörpern liefern. Wird die Abstoßung von allogenen Herztransplantaten tatsächlich durch eine CD8 abhängig Immunantwort vermittelt, müsste durch die CD8 Blockade eine Transplantattoleranz induziert werden. Jedoch lässt sich aus den generierten Daten noch nicht eindeutig rückschließen, aus welchen Gründen die T-Zellantwort in Richtung der CD8⁺ T-Lymphozyten verschoben werden sollte. Einen interessanten Ansatz liefert eine erst vor kurzem veröffentlichte Studie [Zecher *et al.*, 2010]. Zecher *et al.* zeigten, dass NK-Zellen die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen durch den konkurrierenden IL-15 Verbrauch vermindern können. In den Experimenten wurden in Wildtypmäusen, nach anti-CD4 und anti-CD8 Blockade an Tag 0 und Tag 5, NK-Zellen depletiert und die Lymphozytenpopulationen nach 20 Tagen aus der Milz isoliert. Bei Abwesenheit der NK-Zellen erholte sich die CD8 Population, wurden die NK-Zellen hingegen nicht depletiert, konnten keine CD8⁺ T-Zellen detektiert werden. Dabei scheinen die NK-Zellen vornehmlich „natürliche“ Gedächtnis-T-Zellen (CD44^{high}) und nicht naive (CD44^{low}) CD8⁺ T-Zellen zu regulieren. Die Rekonstitution von CD4⁺ T-Zellen verlief hingegen unabhängig von einer NK1.1 Depletion ab. Ferner konnte in der Arbeit demonstriert werden, dass die unterschiedliche Rekonstitution von CD8⁺ T-Zellen bei NK-Zelldefizienz im Vergleich zur Anwesenheit von NK-Zellen durch die zusätzliche Applikation von IL-15 aufgehoben werden konnte. Weiterhin wurden in dem Balb/c auf C57BL/6 Hauttransplantationsmodell die Transplantate nach alleiniger T-Zell-Depletion mit einer MÜZ

von 23,5 Tagen abgestoßen, bei zusätzlicher NK-Zellblockierung wurden die Transplantate hingegen schon nach 16 Tagen rejiziert. Ferner wurden in den NK-Zell-defizienten Tieren in der Milz doppelt so viele CD8⁺ T-Zellen und signifikant erhöhte IFN- γ und TNF- α Konzentrationen detektiert. Zusammenfassend konnten die Autoren zeigen, dass NK-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen um IL-15 konkurrieren und eine Deletion von NK-Zellen zu erhöhter CD8 Proliferation, erhöhten IFN- γ und TNF- α Produktionen und somit zu einer beschleunigten Abstoßung führen. In dem NCR1-Defizienz Modell der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der NCR^{GFP/GFP} Maus noch weitere inhibitorische und aktivierende Ly49 Rezeptoren vorhanden sind (s. Kapitel 3.2.1). Diese scheinen auch in der Abwesenheit des NCR1 Gens in der Lage zu sein NK-Zellen zu aktivieren. Die Anwesenheit der NK-Zellen in dem Herztransplantationsmodell dieser Arbeit könnte, im Vergleich zu einer vollständigen NK-Zelldepletion, zu einer verminderten Aktivität der CD8⁺ T-Zellen führen, wodurch eine verspätete Abstoßung der allogenen Herzen erklärt wird. Die in der vorliegenden Arbeit detektierten reduzierten IL-15 Konzentrationen (s. Kapitel 3.7.2) und die erhöhte CD8⁺ T-Zellfrequenz (s. Kapitel 3.6.2) bei reduzierten NK-Zellfrequenzen (s. Kapitel 3.6.1) in den NCR1-defizienten Empfängertieren am Tag der Abstoßung geben Hinweise darauf, dass auch im Herztransplantationsmodell eine Reduktion von NK-Zellen zu einer IL-15 abhängigen Expansion von CD8⁺ T-Zellen führt. Es wäre interessant, die Theorie der IL-15 Konkurrenz durch weitere Experimente genauer zu analysieren, da eine weitere Arbeit existiert, die eine zentrale Rolle von IL-15 bei der Abstoßung allogener Hauttransplantate nachwies [Kroemer *et al.*, 2008]. Als experimentellen Ansatz könnte ein Herztransplantationsmodell gewählt werden, bei welchem Empfängertiere mit NK-Zell-defizientem bzw. intaktem NK-Zellrepertoire IL-15 appliziert bekommen. Eine IL-15 abhängige Regulation von NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen könnte somit durch folgende Beobachtungen nachgewiesen werden: Ohne zusätzliche IL-15 Applikation zeigen NK-Zell-defiziente Tiere eine Induktion von CD8⁺ T-Zellen. NK-Zell⁺ Empfängertiere haben hingegen eine reduzierte CD8⁺ Zellproliferation. Durch das extern verabreichte IL-15 müsste in den NK-Zell⁺ Tieren die CD8⁺ T-Zellfrequenz ansteigen.

4.2.3 NK-Zellen und regulatorische T-Zellen regulieren sich gegenseitig

Für das Überleben eines transplantierten Organs spielen nicht nur aktive Mechanismen zur Bekämpfung des fremden Gewebes eine Rolle, sondern auch die Fähigkeit des Immunsystems transplantatschädigende Effektorzellen zu unterdrücken und Toleranz zu induzieren. In den letzten zehn Jahren mehrten sich die Hinweise, dass eine kleine Untergruppe der T-Zellen mit supprimierenden Eigenschaften, die sog. regulatorischen T-Zellen, an Abstoßungsmechanismen beteiligt ist. Ihre Fähigkeit CD4

und CD8 T-Zellantworten *in vivo* und *in vitro* zu supprimieren, machen sie zu potenten Kandidaten die Transplantatabstoßung zu unterdrücken [Shevach, 2000; Kingsley *et al.*, 2002]. Während allgemein anerkannt ist, dass die Tregs bei Abstoßungsprozessen CD4 und CD8 Immunantworten supprimieren [Takahashi *et al.*, 1998; Thornton und Shevach, 2000; Piccirillo und Shevach, 2001], existieren nur wenige Arbeiten, die die suppressorische Wirkung der Tregs auf NK-Zellen beschreiben. Jedoch führten sämtliche Daten aus verschiedenen Untersuchungen zu der Erkenntnis, dass die Proliferation und Zytotoxizität gegenüber Tumorzelllinien von ruhenden, nicht aktivierten NK-Zellen, *in vitro* signifikant durch Tregs supprimiert werden kann [Ghiringhelli *et al.*, 2005; Romagnani *et al.*, 2005; Smyth *et al.*, 2006]. Die molekularen Mechanismen über welche die NK-Zellen durch die Tregs supprimiert werden, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch weisen die Daten aus verschiedenen Publikationen darauf hin, dass TGF- β [Ghiringhelli *et al.*, 2005; Smyth *et al.*, 2006; Barao *et al.*, 2006], Perforin und Granzyme B [Grossman *et al.*, 2004] als Mediatoren für die Vermittlung der suppressorischen Wirkung der Tregs auf NK-Zellen dienen.

Bis heute existiert nur eine Arbeit, welche die Wechselwirkungen von NK-Zellen und regulatorischen T-Zellen im Transplantationsmodell dokumentiert [Barao *et al.*, 2006]. In Anlehnung an die Experimente, die das „F1-Hybridresistenz“ Phänomen beschrieben (s. Kapitel 1.4), wurden C57BL/6 (H-2^b) und (C57BL/6 x Balb/c) F1 (H-2^{bxd}) Mäuse bestrahlt und erhielten Balb/c Knochenmark. Sowohl in dem vollallogeenen als auch im Hybridresistenz-Modell, kam es nach Depletion der regulatorischen T-Zellen zu einer vorzeitigen Abstoßung im Vergleich zu Tieren mit funktionellen Tregs. Eine Depletion der NK-Zellen zeigte, dass die Abstoßung abhängig von den NK-Zellen des Empfängers ist, sodass die fehlende Kontrolle der NK-Lymphozyten durch die Tregs für die verfrühte Abstoßung in den Treg-defizienten Tieren diskutiert wurde. Ebenso wurde in der Studie untersucht, welchen Einfluss der adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen auf die Abstoßung von C57BL/6 (H-2^b) Knochenmark durch (C57BL/6 x Balb/c) F1 (H-2^{bxd}) Empfänger hatte. Im Einklang mit ihrer suppressiven Rolle auf NK-Zellen wurde das Knochenmark der mit Tregs behandelten Tiere wesentlich später abgestoßen als die Kontrollgruppe.

Garg *et al.* konnten nachweisen, dass auch NK-Zellen die Expansion von regulatorischen T-Zellen regulieren können. Im humanen System konnte gezeigt werden, dass eine Kokultur von CD4⁺ T-Zellen mit *Mycobacterium tuberculosis* infizierten Monozyten zu einer Expansion aktivierter CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen führt [Garg *et al.* 2008]. Weiterführende *in vitro* Analysen demonstrierten, dass aktivierte NK-Zellen die Fähigkeit besitzen durch *M. tuberculosis* infizierte Monozyten, im Gegensatz zu frisch isolierten, aktivierte Tregs eliminieren zu können.

Ferner wurden bei der NK-Zell-abhängigen Lyse der Tregs eine Induktion verschiedener aktivierender NK-Zellrezeptoren beobachtet. Doch nur eine Neutralisation von NKG2D bzw. NKp46 konnte die Kapazität der NK-Zellen unterdrücken, die Expansion der Tregs zu verhindern. Ebenso wurde eine erhöhte Expression des NKG2D-Liganden ULBP1 auf den aktivierten Tregs beobachtet. Die Autoren nehmen daher an, dass aktivierte NK-Lymphozyten im Infektionsmodell durch Antigenerkennung expandierte Tregs direkt über die aktivierenden NK-Zellrezeptoren NKG2D und NKp46 lysieren können [Roy *et al.*, 2008]. Weiterhin erwähnten zwei aktuell publizierte Arbeiten einen Anstieg von regulatorischen T-Zellen nach NK-Zelldepletion. Mailloux *et al.* zeigten in ihrem „Lewis Lung Carcinoma Modell“ eine reduzierte Infiltration von $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen in den kranken Lungengeweben nach NK-Zelldepletion mit anti-asialo-GM1 [Mailloux *et al.*, 2010]. Xia *et al.* entdeckten außerdem in Diabetes Mäusen, dass NK-Zellen und Tregs um IL-15 konkurrieren können [Xia *et al.*, 2010]. So wurde in den mit IL-15 behandelten, NK-Zell-depletierten NOD Mäusen bei einem leichteren Krankheitsverlauf eine erhöhte suppressorische Aktivität der Tregs beobachtet. *In vitro* konnte dabei gezeigt werden, dass die erhöhte FoxP3 Expression der mit IL-15 behandelten Treg-Zellen durch Kokultivierung von IL-15 aktivierten NK-Zellen wieder aufgehoben werden konnte. In dem murinen Herztransplantationsmodell der vorliegenden Arbeit führt eine NCR1-Defizienz wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben, zu einer signifikant erhöhten Expression von FoxP3⁺ im Transplantat und einer erhöhten Infiltration der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs in die Milz und den Lymphknoten im Vergleich zum Wildtyp. In Übereinstimmung mit der oben genannten Studie von Roy *et al.* unterstützen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass regulatorische T-Zellen bei einer verminderten Expression von NKp46 (NCR1-Defizienz) und NKG2D (s. Kapitel 3.6.1) in den NCR1^{GFP/GFP} Empfängertieren im Gegensatz zu den Wildtyptieren expandieren können. Die detektierten reduzierten Konzentrationen von IL-15 (s. Kapitel 3.7.2) bei einer Akkumulation von regulatorischen T-Zellen und Reduktion der NK-Zellfrequenzen in den NCR1-defizienten Mäusen geben im Einklang mit den Beobachtungen von Xia *et al.* einen Hinweis darauf, dass auch im Transplantationsmodell regulatorische T-Zellen und NK-Zellen um IL-15 konkurrieren könnten.

4.2.4 NCR1-Defizienz unter Kostimulationsblockade

Es ist bekannt, dass T-Zellen neben der Bindung seines TCRs an MHC-Peptidkomplexe ein zusätzliches kostimulatorisches Signal benötigen, um aktiviert zu werden. Die Blockade dieser Kostimulationsmoleküle erscheint als ein vielversprechender Ansatz für die Therapie von Transplantatempfängern. Die Abstoßung von soliden

Organtransplantaten in Abwesenheit der Kostimulation oder unter Kostimulationsblockade wurde bereits von mehreren Gruppen in verschiedenen Modellen analysiert. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Hemmung von CD28/B7 Signalen durch den CTLA-4 Antagonisten das Transplantatüberleben bei Abwesenheit des NCR1 NK-Zellrezeptors beeinflusst und welche zellulären Veränderungen dabei auftreten.

Auf zellulärer Ebene konnte in Wildtyptieren bereits nachgewiesen werden, dass eine Blockade des CD28/B7 Signalweges durch CTLA-4-Ig zu einer erhöhten Apoptose von alloantigen-spezifischen T-Zellen führt, welche eine Toleranz induziert [Li *et al.*, 1999]. In einem allogenen C3H (H-2^K) auf C57BL/6 (H-2^b) Herztransplantationsmodell konnten Zhu *et al.* durch kombinierte CTLA-4-Ig und anti-CD40L (MR1 bzw. CD154) Therapie das Transplantatüberleben auf 43 Tage vs. 8 Tage bei der Wildtypkontrolle verlängern. Die verzögerte Abstoßung ging dabei mit einer reduzierten Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in das Allotransplantat, einer reduzierten Produktion von Th1 (IL-2 und IFN- γ) und Th2 (IL-4 und IL-10) Zytokinen und einer Hemmung der Perforin/GrB bzw. Fas/FasL vermittelten Zytotoxizität einher [Zhu *et al.*, 2008]. In der vorliegenden Arbeit konnten nach Kostimulationsblockade ebenfalls im NCR^{GFP/GFP} Tier und in der Kontrollgruppe eine reduzierte Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in das Spenderherz beobachtet werden. Anhand der vorliegenden Daten (s. Kapitel 3.6.2) konnte ferner ein weiterer Hinweis für die Theorie aufgedeckt werden, dass die Abstoßungsreaktion bei NCR1-Defizienz CD8 abhängig ist. Denn in NCR1-defizienten Mäusen, bei denen eine CD8 abhängige Abstoßung postuliert wird (s. Kapitel 4.2.2), führt eine Kostimulationsblockade im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu einer reduzierten Transplantat-Infiltration von CD8⁺ T-Zellen bei gleichbleibenden CD4⁺ T-Zellwerten. Hingegen zeigten die Daten der Wildtypgruppe, für die im Herztransplantationsmodell eine CD4⁺ T-Zell-vermittelte Rejektion nachgewiesen werden konnte [Ito *et al.*, 2005], nach CTLA-4-Ig Therapie reduzierte Raten an CD4⁺ T-Zellen bei konstanten CD8⁺ T-Zellfrequenzen.

Bei der Analyse der regulatorischen T-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit unter Kostimulationsblockade unabhängig von der An- oder Abwesenheit von NCR1 eine Dezimierung von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozyten nachgewiesen werden (s. Kapitel 3.6.3). Einen interessanten Ansatz zur Erklärung dieses Phänomens lieferten die Arbeiten von Salomon *et al.* und Tang *et al.* In NOD Mäusen („nonobese diabetes“) konnte gezeigt werden, dass Tregs die Entwicklung von Diabetes kontrollieren [Salomon *et al.*, 2000]. Unter Abwesenheit von CD28 kostimulatorischen Signalen entwickelte sich ein aggressiverer Krankheitsverlauf unter massiver Abnahme von regulatorischen T-Zellen. Weiterführende Analysen konnten aufzeigen, dass CD28 die

Reifung im Thymus und die periphere Homöostase von regulatorischen T-Zellen kontrolliert. Dabei fördert das Molekül das Überleben der Tregs durch die Regulation der IL-2 Produktion durch konventionelle T-Zellen und über die Expression von CD25 auf den Tregs [Tang *et al.*, 2003].

In dem vorliegenden Transplantationsmodell unter Verwendung von C57BL/6 bzw. NCR1^{GFP/GFP} Empfängertieren wurden die Herzen nach CTLA-4-Ig Injektion 7 bzw. 8 Tage verzögert im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen abgestoßen (s. Kapitel 3.3.1). Mit dem verwendeten Protokoll der Kostimulationsblockade konnte somit auch bei NCR1-Defizienz keine wesentlich längere bzw. Langzeit-Akzeptanz erreicht werden, sodass der Rückschluss nahe liegt, dass kostimulatorische Signale bei der Transplantatabstoßung unter NCR1-Defizienz keine Rolle spielen. Jedoch scheinen, wie bereits in Kapitel 4.1 erwähnt wurde, in dem Herztransplantationsmodell die Applikationszeitpunkte der blockierenden Antikörper eine wichtige Rolle zu spielen, denn bei Verwendung der gleichen Klone in ähnlichen Dosen werden gravierende Unterschiede in der Dauer des Transplantatüberlebens in den verschiedenen Studien beobachtet. So führte eine Injektion von CTLA-4-Ig ab Tag 2 nach der Transplantation beginnend, alle 2 Tage für 3 Dosen zu einer Akzeptanz des Transplantates für über 100 Tage [Szot *et al.*, 2001]. Beginnt die Injektion bereits am Tag der Transplantation (Tag 0) und wird in 3 – 4 Tagesabständen bis Tag 10 verabreicht, so ist bereits ab dem 22. Tag das Transplantatüberleben beeinträchtigt [Kim *et al.*, 2007]. Weitere Studien zeigten, dass sogar ein *Single-shot* von 200µg CTLA-4-Ig am zweiten Tag nach der Operation zu einer Transplantatakzeptanz führt [Hancock *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1993]. Eine Toleranz kann auch induziert werden, wenn die Applikation an Tag 0 startet und über 12 Tage verabreicht wird [Pearson *et al.*, 1994]. In der vorliegenden Studie wurde das Injektionsschema mit weniger Toleranz-induzierender Wirkung mit Startzeitpunkt am Tag der Transplantation gewählt (s. Kim *et al.*), da so die Unterschiede zwischen den beiden Rezipientstämmen (Wildtyp vs. NCR1^{GFP/GFP}) besser differenziert werden sollten. In einem Hauttransplantationsmodell konnte bei gleicher Spender-Empfängerkombination wie in der vorliegenden Arbeit durch Injektion von CTLA-4-Ig und anti-CD40L auch nach Depletion der NK1.1⁺ Zellen kein verlängertes Transplantatüberleben nachgewiesen werden [Trambley *et al.*, 1999]. Doch fallen bei Betrachtung des Depletionsschemas Kritikpunkte auf. In der Studie begann die Behandlung der Tiere am Tag der Hautverpflanzung und erfolgte postoperativ einmal wöchentlich. Es ist bekannt, dass NK-Zellen bereits wenige Stunden nach der Operation in das Transplantat infiltrieren, doch wurde nachgewiesen, dass eine effektive Deletion von NK-Zellen ca. 48 Stunden benötigt [Tertilt, Promotion 2002], sodass die Blockierung schon zwei Tage vor der Transplantation beginnen sollte. Auch

scheint es möglich zu sein, dass die Zeitspanne von sieben Tagen zwischen zwei Injektionen zu groß gewählt ist und einige NK-Zellen nicht effizient genug blockiert wurden. Es ist bekannt, dass eine vollständige Blockierung von NK1.1⁺ NK-Zellen in CD28-defizienten Mäusen das Transplantatüberleben von allogenen Herzen jedoch signifikant erhöhen konnte [Maier *et al.*, 2001]. Es ist daher möglich, dass unter Verwendung eines anderen CTLA-4-Ig Depletionsprotokolls die Kostimulationsblockade das Transplantat-überleben der NCR1^{GFP/GFP} Mäuse wesentlich stärker verlängert als in Wildtyptieren.

4.3 FÜR DIE VERZÖGERTE ABSTOßUNG BEI NCR1-DEFIZIENZ IST DIE MODULATION DER ANGEBORENEN UND ERWORBENEN IMMUNANTWORT VERANTWORTLICH

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das Fehlen des NCR1 Rezeptors bei der Transplantatabstoßung nicht nur die natürliche sondern auch die adaptive Immunantwort beeinflusst. NK-Zellen sind allein nicht in der Lage, solide Organtransplantate abzustößen, jedoch könnten sie durch direkte Zerstörung von Transplantatzellen, durch Interaktionen mit T-Zellen oder durch Aktivierung von APCs eine entscheidende Rolle in der Transplantatabstoßung spielen. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine alleinige Deletion des murinen aktivierenden zytotoxischen NK-Rezeptors NCR1, welcher spezifisch auf Natürlichen Killerzellen exprimiert wird, bereits ausreichend ist, allogene Herztransplantate verzögert abzustößen. Die verlängerte Toleranz der Transplantate ging auf zellulärer Ebene mit einer reduzierten Transplantat-Infiltration und Zellfrequenz von NK-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen einher. Ferner wurde eine reduzierte CD4⁺ T-Zellfrequenz zugunsten einer CD8⁺ T-Zellexpansion beobachtet. Korrelierend mit der reduzierten Akkumulation von NK-Zellen wurden in den NCR1^{GFP/GFP} Empfängertieren vor allem am Tag der Abstoßung eine verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und Effektormolekülen wie Granzyme B, Perforin und IL-15 gemessen.

In Anlehnung an das in dieser Arbeit entwickelte Schema zur Rolle von NK-Zellen in der Transplantatabstoßung aus Kapitel 4.1.1, wird folgendes Modell zur Erklärung der verzögerten Abstoßung vorgeschlagen (s. Abb. 30):

Da NCR1-deletierte NK-Zellen über ein intaktes Repertoire anderer inhibierender und aktivierender NK-Zellrezeptoren verfügen, sind sie durchaus in der Lage aufgrund des MHC-Klasse-I mismatch zwischen Spender und Empfänger aktiviert zu werden. Jedoch

führt die verminderte Proliferation und Infiltration von NK-Zellen zu einer reduzierten Zytokinfreisetzung. Dieses führt zu einer reduzierten Infiltration der NK-Zellen in das Allotransplantat. Durch die verminderte Infiltration von NK-Zellen werden im Allotransplantat weniger Zytokine und Effektormoleküle wie IFN- γ , Granzyme B und Perforin ausgeschüttet, die das allogene Herzgewebe weniger schädigen.

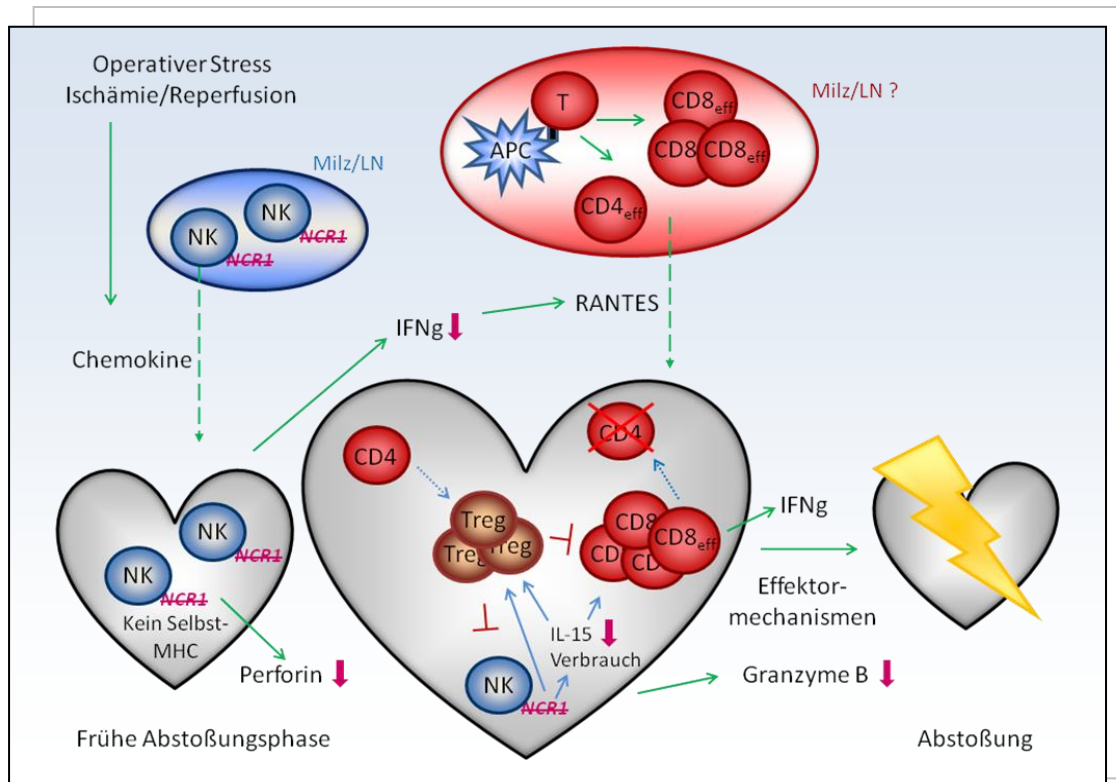


Abb.30: Schematische Darstellung der möglichen Mechanismen einer Transplantatabstoßung bei NCR1-Defizienz

- Aktivierung von Lymphozyten bzw. Produktion von Effektormolekülen
- Wanderung von Lymphozyten zwischen verschiedenen Organen
- Donor-Antigene
- ⊥ Suppression der Tregs auf andere Lymphozyten
- Hypothesen zum immunregulatorischen Einfluss der NCR1-Deletion

Die produzierten Zytokinmengen scheinen dennoch ausreichend zu sein, T-Zellen zu aktivieren und in das Transplantat zu rekrutieren, um dort durch ihre Effektormechanismen das Transplantat erfolgreich zu rejizieren. Ferner scheint die verminderte Aktivierung und Proliferation von NK-Zellen bei NCR1-Defizienz sich positiv auf die Expansion von CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ suppressiven T-Zellen auszuwirken, da diese nun mit weniger NK-Zellen um IL-15 konkurrieren müssen [Zeher *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2010]. Es ist auch möglich, dass die Expansion der Tregs direkt durch die Abwesenheit von NCR1 ermöglicht wurde, da in humanen Studien nachgewiesen wurde, dass NKp46 und NKG2D für die Lyse von regulatorischen

T-Zellen verantwortlich sind [Roy *et al.*, 2008]. Die Anreicherung von CD8⁺ T-Zellen verdrängt zum Tag der Abstoßung hin CD4⁺ T-Zellen, welche nur in der Initialphase der Rejektion eine Rolle zu spielen scheinen [Szot *et al.*, 2001]. Welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, konnte anhand der generierten Daten nicht eindeutig ermittelt werden. Jedoch belegen Studien, dass induzierbare Tregs (iTreg) sich in der Peripherie auch aus naiven CD4⁺ T-Zellen durch die Einwirkung von TGF-β entwickeln können [Yamagiwa *et al.*, 2001]. In Mäusen sind diese iTreg-Zellen phänotypisch und funktionell den Thymus-generierten Tregs sehr ähnlich und können sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation von konventionellen T-Zellen supprimieren [Huter *et al.*, 2008; Horwitz *et al.*, 2008]. Diese These könnte in dem vorliegenden Transplantationsmodell sowohl die Reduktion der CD4⁺ T-Zellen als auch den Anstieg der Tregs im Spenderherzen erklären.

Die Daten der vorliegenden Studie weisen somit darauf hin, dass die verminderte Anzahl der NK-Zellen und die Expansion der Tregs zu der verzögerten Abstoßung führen, die massive Induktion der CD8⁺ T-Zellen jedoch dazu führt, dass das Transplantat dennoch abgestoßen wird. Abschließend postulieren wir, dass NK-Zellen die Expansion von CD8⁺ T-Zellen und Treg im Transplantationsmodell regulieren und die Deletion des aktivierenden Rezeptors NCR1 durch verminderte Zytotoxizität und Reifung der NK-Zellen zu einer CD8⁺ T-Zell-abhängigen Abstoßung im allogenen Herztransplantationsmodell führt. Es wurden somit weitere Hinweise gefunden, dass Natürliche Killerzellen nicht nur natürliche Immunantworten beeinflussen, sondern auch über den konkurrierenden Zytokinverbrauch die adaptive Immunität stark modulieren können.

Zur Bestätigung der in dieser Arbeit aufgestellten Thesen sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Aus den generierten Daten geht nicht eindeutig hervor, ob die NK-Zellen die Produzenten von IFN-γ sind, da das Zytokin auch von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen produziert wird [Marcucci *et al.*, 1981]. Weiterhin werden durch die Detektion von RANTES und IL-15 im Serum die Konzentrationen der zirkulierenden Lymphozyten detektiert und nicht zwischen den unterschiedlichen Organen unterschieden. Ferner könnte eine CD8 abhängige Immunantwort in dem NCR1^{GFP/GFP} Herztransplantationsmodell durch eine CD8 Blockade nachgewiesen werden (s. Kapitel 4.2.2). Die Hypothese der IL-15 abhängigen Regulation von CD8⁺ und regulatorischen T-Zellen durch NK-Zellen in der Abstoßung allogener Herztransplantate könnte durch Applikation von externem IL-15 bestätigt werden (s. Kapitel 4.2.2 und 4.2.3).

I) ZUSAMMENFASSUNG

Eine Vielzahl der heute verwendeten Immunsuppressiva ist nebenwirkungsreich und wirkt häufig unspezifisch. Daher ist das Ziel neuer Studien, unter Berücksichtigung der molekularen Mechanismen der Transplantatabstoßung, optimierte Strategien für eine gezielte Immunsuppression zu entwickeln. In diesem Zusammenhang mehren sich die Hinweise, dass NK-Zellen durch Beeinflussung der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Abstoßung übernehmen. Bisherige Analysen zur Funktion von NK-Zellen in der akuten Abstoßung fokussierten jedoch auf Rezeptoren wie NK1.1 und NKG2D, welche u.a. auch auf T- und NKT-Zellen exprimiert werden.

Im Mittelpunkt dieser Dissertationsarbeit stand daher die Identifikation der Rolle des aktivierenden Zytotoxizitätsrezeptor NCR1 (NKp46), welcher spezifisch auf NK-Zellen exprimiert wird. Als Grundlage zur Untersuchung der Funktion von NCR1 in der Transplantatabstoßung diente das Modell der heterotopen Herztransplantation in der Wildtyp bzw. $\text{NCR1}^{\text{GFP/GFP}}$ Maus, welche anstelle von NCR1 das GFP-Reportergen exprimiert. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Infiltration von verschiedenen Lymphozytenpopulationen in das Spenderorgan unter kinetischen Gesichtspunkten untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass NK- und DC-Populationen bereits vor den T-Zellen im Allotransplantat akkumulieren. Die dazu reziprok verlaufenen Profile in den Milzen und Lymphknoten lassen vermuten, dass eine Migration der Zellen aus den lymphatischen Organen in das Transplantat stattfindet. Im zweiten Teil der Studie wurden zum Wildtyp vergleichende Analysen in $\text{NCR1}^{\text{GFP/GFP}}$ Mäusen durchgeführt. Interessanterweise stießen NCR1-defiziente Mäuse die Spenderherzen im Vergleich zum Wildtyp mit zwei Tagen Verzögerung ab. Obwohl naive NK-Zellen aus NCR1-defizienten Mäusen eine signifikant geringere zytotoxische Aktivität besaßen, stieg die Zytotoxizität nach der Transplantation auf zum Wildtyp vergleichbare Werte an. Dank des GFP-Signals konnte bewiesen werden, dass im Transplantat detektierte NK-Zellen tatsächlich vom Empfänger stammen. Ebenso wurde gezeigt, dass NK-Zellen nach der Transplantation in der Milz auch in T-Zellzonen bzw. in die Marginalzone migrieren. Weiterhin führte eine NCR1-Defizienz nach Transplantation zu einer reduzierten NK-Zellinfiltration, verminderten Produktion von Zytokinen und Effektormolekülen (IFN- γ , Granzyme B, Perforin) sowie einer Verringerung von CD4^+ T-Zellen bei gleichzeitiger Induktion von CD8^+ T-Zellen und Tregs.

Die Ergebnisse sprechen für einen Beleg, dass der NK-Zell-spezifische Rezeptor NCR1 im Abstoßungsprozess immunregulatorisch auf die adaptive Immunantwort und Toleranzinduktion wirkt. Diese Ergebnisse sind insbesondere von klinischer Relevanz, da NK-Zellen in zeit- und zielgerichteten immunmodulierenden Therapiestrategien zur Verlängerung des Transplantatüberlebens nur unzureichend als Gegenstand von Untersuchungen dienten.

II) LITERATURVERZEICHNIS

- Alamartine, E; Sabido, O; Berthoux, F (1994). In-vitro effects of cyclosporin A, FK506, 6-mercaptopurine, and prednisolone on lymphokine-activated killer cells. Nephrol Dial Transplant 9(10):1456-61.
- Algarra, I; Cabrera, T; Garrido, F (2000). The HLA crossroad in tumor immunology. Hum Immunol 61(1):65-73.
- Anderson, SK; Dewar, K; Goulet, ML; Leveque, G; Makrigiannis, AP (2005). Complete elucidation of a minimal class I MHC natural killer cell receptor haplotype. Genes Immun 6(6):481-92.
- Arase, H; Mocarski, ES; Campbell, AE; Hill, AB; Lanier, LL (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. Science 296, 1323-1326.
- Arase, H; Arase, N; Saito, T (1995). Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. J Exp Med 181(3):1235-8.
- Atkinson, EA; Gerrard, JM; Hildes, GE; Greenberg, AH (1990). Studies of the mechanism of natural killer (NK) degranulation and cytotoxicity. J Leukoc Biol 47(1):39-48.
- Azuma, H; Paul, LC; Tilney, NL (1996). Insights into acute and chronic rejection. Transplant Proc 28(4): 2081-4.
- Baldwin, WM 3rd; Larsen, CP; Fairchild, RL (2001). Innate immune responses to transplants: a significant variable with cadaver donors. Immunity 14(4):369-76.
- Barao, I; Hanash, AM; Hallett, W; Welniak, LA; Sun, K; Redelman, D; Blazar, BR; Levy, RB; Murphy, WJ (2006). Suppression of natural killer cell-mediated bone marrow cell rejection by CD4+CD25+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci USA 103(14):5460-5.
- Becker, S; Kiessling, R; Lee, N; Klein, G (1978). Modulation of sensitivity to natural killer cell lysis after in vitro explantation of a mouse lymphoma. J Natl Cancer Inst 61(6):1495-8.
- Beuneu, H; Deguine, J; Breart, B; Mandelboim, O; Di Santo, JP; Bousso, P (2009). Dynamic behavior of NK cells during activation in lymph nodes. Blood 114(15):3227-34.
- Biassoni, R; Pessino, A; Bottino, C; Pende, D; Moretta, L; Moretta, A (1999). The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. Eur J Immunol 29(3):1014-20.
- Binah, O (1994). Immune effector mechanisms in heart transplant rejection. Cardiovasc Res 28(12):1748-57.
- Biron, CA; Brossay, L (2001). NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. Curr Opin Immunol 13(4):458-64.

- Bishop, DK; Chan, Wood S; Eichwald, EJ; Orosz, CG (2001). Immunobiology of allograft rejection in the absence of IFN-gamma: CD8+ effector cells develop independently of CD4+ cells and CD40-CD40 ligand interactions. J Immunol 166(5):3248-55.
- Bix, M; Liao, NS; Zijlstra, M; Loring, J; Jaenisch, R; Raulet, D (1991). Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. Nature 349(6307):329-31.
- Brennan, J; Mager, D; Jefferies, W; Takei, F (1994). Expression of different members of the Ly-49 gene family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties. J Exp Med 180(6):2287-95.
- Brunkow, ME; Jeffrey, EW; Hjerrield, KA; Paepers, B; Clark, LB; Yasayko, SA; Wilkinson, JE; Galas, D; Ziegler SF; Ramsdell, F (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet 27, 1, 68–73
- Buggins, AG; Mufti, GJ; Salisbury, J; Codd, J; Westwood, N; Arno, M; Fishlock, K; Pagliuca, A; Devereux, S (2002). Peripheral blood but not tissue dendritic cells express CD52 and are depleted by treatment with alemtuzumab. Blood 100(5):1715-20.
- Bush, WW (1999). Overview of transplantation immunology and the pharmacotherapy of adult solid organ transplant recipients: focus on immunosuppression. AACN Clin Issues 10(2):253-69; quiz 304-6.
- Butcher, EC (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. Cell 67(6):1033-6.
- Butcher, EC; Picker, LJ (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. Science 272(5258):60-6.
- Calne, R; Friend, P; Moffatt, S; Bradley, A; Hale, G; Firth, J; Bradley, J; Smith, K; Waldmann, H (1998). Proper tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. Lancet 351(9117):1701-2.
- Calne, R; Moffatt, SD; Friend, PJ; Jamieson, NV; Bradley, JA; Hale, G; Firth, J; Bradley, J; Smith, KG; Waldmann, H (1999). Campath 1H allows low-dose cyclosporine monotherapy in 31 cadaveric renal allograft recipients. Transplantation 68(10):1613-6.
- Campbell, KS; Colonna, M (1999). DAP12: a key accessory protein for relaying signals by natural killer cell receptors. Int J Biochem Cell Biol 31(6):631-6.
- Campos, L; Naji, A; Deli, BC; Kern, JH; Kim, JI; Barker, CF; Markmann, JF (1995). Survival of MHC-deficient mouse heterotopic cardiac allografts. Transplantation 59(2):187-91.
- Carrel, A; Guthrie, CC (1905). Functions of a transplanted kidney. Science 22(563):473.
- Carrel, D (1964). Operative technic of vascular anastomoses and visceral transplantation. Lyon Med 212:1561-8.

- Chapman, JR; Taylor, C; Ting, A; Morris, PJ (1986). Hyperacute rejection of a renal allograft in the presence of anti-HLA-Cw5 antibody. Transplantation 42(1): 91-3.
- Chirgwin, JM; Przybyla, AE; MacDonald, RJ; Rutter, WJ (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18(24):5294-9.
- Colucci, F; Caligiuri, MA; Di Santo, JP (2003). What does it take to make a natural killer? Nat Rev Immunol 3(5):413-25.
- Cooper, MA; Fehniger, TA; Caligiuri, MA (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol 22(11):633-40.
- Correa, I; Raulet, DH (1995). Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. Immunity 2(1):61-71.
- Costello, RT; Sivori, S; Marcenaro, E; Lafage-Pochitaloff, M; Mozziconacci, MJ; Reviron, D; Gastaut, JA; Pende, D; Olive, D; Moretta, A (2002). Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. Blood 99(10):3661-7.
- Coudert, JD; Coureau, C; Guéry, JC (2002). Preventing NK cell activation by donor dendritic cells enhances allospecific CD4 T cell priming and promotes Th type 2 responses to transplantation antigens. J Immunol 169(6):2979-87.
- Crow, MK (2004). Costimulatory molecules and T-cell-B-cell interactions. Rheum Dis Clin North Am 30(1):175-91, vii-viii.
- Cudkowicz, G; Rossi, GB (1972). Hybrid resistance to parental DBA-2 grafts: independence from the H-2 locus. I. Studies with normal hematopoietic cells. J Natl Cancer Inst 48(1):131-9.
- De Maria, A; Fogli, M; Costa, P; Murdaca, G; Puppo, F; Mavilio, D; Moretta, A; Moretta, L (2003). The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). Eur J Immunol 33(9):2410-8.
- del Val, M; Hengel, H; Häcker, H; Hartlaub, U; Ruppert, T; Lucin, P; Koszinowski, UH (1992). Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. J Exp Med 176(3):729-38.
- Denton, MD; Magee, CC; Sayegh, MH (1999). Immunosuppressive strategies in transplantation. Lancet 353(9158):1083-91.
- Falco, M; Cantoni, C; Bottino, C; Moretta, A; Biassoni, R (1999). Identification of the rat homologue of the human NKp46 triggering receptor. Immunol Lett 68(2-3):411-4.
- Ferlazzo, G; Münz, C (2004). NK cell compartments and their activation by dendritic cells. J Immunol 172(3):1333-9.
- Fischer, K; Mackensen, A (2003). The flow cytometric PKH-26 assay for the determination of T-cell mediated cytotoxic activity. Methods 31(2):135-42.

- Frauwirth, KA and Thompson, CB (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. J Clin Invest 109(3):295-9.
- Garg, A; Barnes, PF; Roy, S; Quiroga, MF; Wu, S; García, VE; Krutzik, SR; Weis, SE; Vankayalapati, R (2008). Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. Eur J Immunol 38(2):459-69.
- Gazit, R; Gruda, R; Elboim, M; Arnon, TI; Katz, G; Achdout, H; Hanna, J; Qimron, U; Landau, G; Greenbaum, E; Zakay-Rones, Z; Porgador, A; Mandelboim, O (2006). Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1. Nat Immunol 7(5):517-23.
- George, TC; Mason, LH; Ortaldo, JR; Kumar, V; Bennett, M (1999). Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells. J Immunol 162(4):2035-43.
- Ghiringhelli, F; Ménard, C; Terme, M; Flament, C; Taieb, J; Chaput, N; Puig, PE; Novault, S; Escudier, B; Vivier, E; Lecesne, A; Robert, C; Blay, JY; Bernard, J; Caillat-Zucman, S; Freitas, A; Tursz, T; Wagner-Ballon, O; Capron, C; Vainchenker, W; Martin, F; Zitvogel, L (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. J Exp Med 202(8):1075-85.
- Gibson, T and Medawar, PB (1943). The fate of skin homografts in man. J Anat, Lond, 77, 299-310.
- Gottlieb, J; Welte, T; Höper, MM; Strüber, M; Niedermeyer, J (2004). Lung transplantation. Possibilities and limitations. Internist (Berl) 45, 11, 1246–1259.
- Gould, DS and Auchincloss, H Jr (1999). Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. Immunol Today 20(2):77-82.
- Graca, L; Cobbold, SP; Waldmann, H (2002). Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. J Exp Med 195(12):1641-6.
- Grégoire, C; Chasson, L; Luci, C; Tomasello, E; Geissmann, F; Vivier, E; Walzer, T (2007). The trafficking of natural killer cells. Immunol Rev 220:169-82.
- Grossman, WJ; Verbsky, JW; Barchet, W; Colonna, M; Atkinson, JP; Ley, TJ (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. Immunity 21(4):589-601.
- Gummert, JF; Ikonen, T; Morris, RE (1999). Newer immunosuppressive drugs: a review. J Am Soc Nephrol 10(6):1366-80.
- Gur, C; Porgador, A; Elboim, M; Gazit, R; Mizrahi, S; Stern-Ginossar, N; Achdout, H; Ghadially, H; Dor, Y; Nir, T; Doviner, V; Hershkovitz, O; Mendelson, M; Naparstek, Y; Mandelboim, O (2010). The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. Nat Immunol 11(2):121-8.
- Halfteck, GG; Elboim, M; Gur, C; Achdout, H; Ghadially, H; Mandelboim, O (2009). Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. J Immunol 182(4):2221-30.

- Hamerman, JA; Ogasawara, K; Lanier, LL (2005). NK cells in innate immunity. Curr Opin Immunol 17(1):29-35.
- Hancock, WW; Sayegh, MH; Zheng, XG; Peach, R; Linsley, PS; Turka, LA (1996). Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. Proc Natl Acad Sci USA 26;93(24):13967-72.
- Hanke, T; Takizawa, H; Raulet, DH (2001). MHC-dependent shaping of the inhibitory Ly49 receptor repertoire on NK cells: evidence for a regulated sequential model. Eur J Immunol 31(11):3370-9.
- Hasegawa, T; Visovatti, SH; Hyman, MC; Hayasaki, T; Pinsky, DJ (2007). Heterotopic vascularized murine cardiac transplantation to study graft arteriopathy. Nat Protoc 2(3):471-80.
- Heidecke, CD; Araujo, JL; Kupiec-Weglinski, JW; Abbud-Filho, M; Araneda, D; Stadler, J; Siewert, J; Strom, TB; Tilney, NL (1985). Lack of evidence for an active role for natural killer cells in acute rejection of organ allografts. Transplantation 40(4):441-4.
- Held W; Kunz B; Ioannidis V; Lowin-Kropf B (1999). Mono-allelic Ly49 NK cell receptor expression. Semin Immunol 11(5):349-55.
- Held, W; Kunz, B (1998). An allele-specific, stochastic gene expression process controls the expression of multiple Ly49 family genes and generates a diverse, MHC-specific NK cell receptor repertoire. Eur J Immunol 28(8):2407-16.
- Held, W; Raulet, DH (1997). Ly49A transgenic mice provide evidence for a major histocompatibility complex-dependent education process in natural killer cell development. J Exp Med 185(12):2079-88.
- Held, W; Roland, J; Raulet, DH (1995). Allelic exclusion of Ly49-family genes encoding class I MHC-specific receptors on NK cells. Nature 376(6538):355-8.
- Henkart, PA (1985). Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. Annu Rev Immunol 31-58.
- Herberman, RB; Nunn, ME; Lavrin, DH (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. Int J Cancer 16(2):216-29.
- Hollyoake, M; Campbell, RD; Aguado, B (2005). Nkp30 (NCR3) is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains, but an expressed gene in *Mus caroli*. Mol Biol Evol 22(8):1661-72.
- Honey, K; Cobbold, SP; Waldmann, H (1999). CD40 ligand blockade induces CD4+ T cell tolerance and linked suppression. J Immunol 163(9):4805-10.
- Hori, S; Takahashi, T; Sakaguchi, S (2003). Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. Adv Immunol 81:331-71.
- Horwitz, DA; Zheng, SG; Gray, JD (2008). Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. Trends Immunol 29(9):429-35.

- Hume, DM; Merrill, JE; Miller, BF; Thorn, GW (1955). Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. J Clin Invest 34: 327.
- Hurwitz, AA; Kwon, ED; van Elsas, A (2000). Costimulatory wars: the tumor menace. Curr Opin Immunol 12(5):589-96.
- Huter, EN; Punkosdy, GA; Glass, DD; Cheng, LI; Ward, JM; Shevach, EM (2008). TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice. Eur J Immunol 38(7):1814-21.
- Ishigami, S; Natsugoe, S; Tokuda, K; Nakajo, A; Che, X; Iwashige, H; Aridome, K; Hokita, S; Aikou, T (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. Cancer 88(3):577-83.
- Ito, T; Ueno, T; Clarkson, MR; Yuan, X; Jurewicz, MM; Yagita, H; Azuma, M; Sharpe, AH; Auchincloss, H Jr; Sayegh, MH; Najafian, N (2005). Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo. J Immunol 174(11):6648-56.
- Jenkins, MK; Schwartz, RH (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. J Exp Med 165(2):302-19.
- Jones, EP; Xiao, H; Schultz, RA; Flaherty, L; Trachtulec, Z; Vincek, V; Larin, Z; Lehrach, H; Lindahl, KF (1995). MHC class I gene organization in > 1.5-Mb YAC contigs from the H2-M region. Genomics 27(1):40-51.
- Jones, G (1973). The number of reactive cells in mouse lymphocyte cultures stimulated by phytohemagglutinin, concanavalin A or histocompatibility antigen. J Immunol 111: 914-920.
- Jordan, SC; Yap, HK; Sakai, RS; Alfonso, P; Fitchman, M (1988). Hyperacute allograft rejection mediated by anti-vascular endothelial cell antibodies with a negative monocyte crossmatch. Transplantation 46(4): 585-7.
- Kageyama, S; Matsui, S; Hasegawa, T; Yoshida, Y; Sato, H; Yamamura, J; Kurokawa, M; Yamamoto, H; Shiraki, K (1997). Augmentation of natural killer cell activity induced by cytomegalovirus infection in mice treated with FK506. Acta Virol 41(4):215-20.
- Kane, KP (1994). Ly-49 mediates EL4 lymphoma adhesion to isolated class I major histocompatibility complex molecules. J Exp Med 179(3):1011-5.
- Karlhofer, FM; Ribaud, RK; Yokoyama, WM (1992). MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. Nature 358(6381):66-70.
- Kiessling, R; Klein, E; Pross, H; Wigzell, H (1975) "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. Eur J Immunol 5(2):117-21
- Kiessling, R; Klein, E; Wigzell, H (1975). Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur J Immunol 5(2):112-7.

- Kim, J; Chang, CK; Hayden, T; Liu, FC; Benjamin, J; Hamerman, JA; Lanier, LL; Kang, SM (2007). The activating immunoreceptor NKG2D and its ligands are involved in allograft transplant rejection. J Immunol 179(10):6416-20.
- Kingsley, CI; Karim, M; Bushell, AR; Wood, KJ (2002). CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. J Immunol 168(3):1080-6.
- Kitchens, WH; Uehara, S; Chase, CM; Colvin, RB; Russell, PS; Madsen, JC (2006). The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance. Transplantation 81(6):811-7.
- Korten, S; Wilk, E; Gessner, JE; Meyer, D; Schmidt, RE (1999). Altered donor and recipient Ly49+ NK cell subsets in allogeneic H-2d --> H-2b and H-2b --> H-2d bone marrow chimeras. J Immunol 163(11):5896-905.
- Krensky, AM; Weiss, A; Crabtree, G; Davis, MM; Parham, P (1990). T-lymphocyteantigen interactions in transplant rejection. N Engl J Med 322: 510-517.
- Krieger, NR; Yin, DP; Fathman, CG (1996). CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection. J Exp Med 184(5):2013-8.
- Kroemer, A; Xiao, X; Degauque, N; Edtinger, K; Wei, H; Demirci, G; Li, XC (2008). The innate NK cells, allograft rejection, and a key role for IL-15. J Immunol 180(12):7818-26.
- Kubota, A; Kubota, S; Lohwasser, S; Mager, DL; Takei, F (1999). Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice. J Immunol 163(1):212-6.
- Kupiec-Weglinski, JW and Hancock, WW (1996). Hyperacute and accelerated allograft rejection. In Transplantation Biology, NL Tilney, TB Strom, and LC Paul, Editors. Lippincott-Raven, New York. 541-556 pp.
- Lakshmikanth, T; Burke, S; Ali, TH; Kimpfler, S; Ursini, F; Ruggeri, L; Capanni, M; Umansky, V; Paschen, A; Sucker, A; Pende, D; Groh, V; Biassoni, R; Höglund, P; Kato, M; Shibuya, K; Schadendorf, D; Anichini, A; Ferrone, S; Velardi, A; Kärre, K; Shibuya, A; Carbone, E; Colucci, F (2009). NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. J Clin Invest 119(5):1251-63. doi: 10.1172/JCI36022.
- Lanier, LL (2001). On guard--activating NK cell receptors. Nat Immunol 2(1):23-7.
- Lanier, LL (2003). Natural killer cell receptor signaling. Curr Opin Immunol 15(3):308-14.
- Lanier, LL; Corliss, BC; Wu, J; Leong, C; Phillips, JH (1998). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. Nature 391(6668):703-7.
- Lefkowitz, M; Kornbluth, J; Tomaszewski, JE; Jorkasky, DK (1988). Natural killer-cell activity in cyclosporine-treated renal allograft recipients. J Clin Immunol 8(2):121-7.

- Li, Y; Li, XC; Zheng, XX; Wells, AD; Turka, LA; Strom, TB (1999). Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. Nat Med 5(11):1298-302.
- Liao, NS; Bix, M; Zijlstra, M; Jaenisch, R; Raulet, D (1991). MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. Science 253(5016):199-202.
- Lin, H; Bolling, SF; Linsley, PS; Wei, RQ; Gordon, D; Thompson, CB; Turka, LA (1993). Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. J Exp Med 178(5):1801-6.
- Lindberg, J; Martín-Fontecha, A; Höglund, P (1999). Natural killing of MHC class I(-) lymphoblasts by NK cells from long-term bone marrow culture requires effector cell expression of Ly49 receptors. Int Immunol 11(8):1239-46.
- Linsley, PS; Greene, JL; Tan P; Bradshaw, J; Ledbetter, JA; Anasetti, C; Damle, NK (1992). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. J Exp Med 176(6):1595-604.
- Ljunggren, HG; Kärre, K (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. Immunol Today 11(7):237-44.
- Lowry, RP (1996). DTH-induced injury. In Transplantation Biology, NL Tilney, TB Strom, and LC Paul, Editors. Lippincott-Raven, New York. 487-502 pp.
- Maier, S; Tertilt, C; Chambron, N; Gerauer, K; Hüser, N; Heidecke, CD; Pfeffer, K (2001). Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28-/- mice. Nat Med 7(5):557-62.
- Mailloux, AW; Clark, AM; Young, MR (2010). NK depletion results in increased CCL22 secretion and Treg levels in Lewis lung carcinoma via the accumulation of CCL22-secreting CD11b+CD11c+ cells. Int J Cancer 127(11):2598-611.
- Makrigiannis, AP; Anderson, SK (2001). The murine Ly49 family: form and function. Arch Immunol Ther Exp 49(1):47-50.
- Mandelboim, O; Lieberman, N; Lev, M; Paul, L; Arnon, TI; Bushkin, Y; Davis, DM; Strominger, JL; Yewdell, JW; Porgador, A (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. Nature 22;409(6823):1055-60.
- Marcucci, F; Waller, M; Kirchner, H; Krammer, P (1981). Production of immune interferon by murine T-cell clones from long-term cultures. Nature 291(5810):79-81.
- Marfaing-Koka A; Devergne O; Gorgone G; Portier A; Schall TJ; Galanaud P; Emilie D (1995). Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. J Immunol 154(4):1870-8.
- Mason, DW; Morris, PJ (1986). Effector mechanisms in allograft rejection. Annu Rev Immunol 4:119-45.

- Mason, LH; Ortaldo, JR; Young, HA; Kumar, V; Bennett, M; Anderson, SK (1995). Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1: a member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2). J Exp Med 182(2):293-303.
- McNerney, ME; Lee, KM; Zhou, P; Molinero, L; Mashayekhi, M; Guzior, D; Sattar, H; Kuppireddi, S; Wang, CR; Kumar, V; Alegre, ML (2006). Role of natural killer cell subsets in cardiac allograft rejection. Am J Transplant 6(3):505-13.
- McQueen, KL; Freeman, JD; Takei, F; Mager, DL (1998). Localization of five new Ly49 genes, including three closely related to Ly49c. Immunogenetics 48(3):174-83.
- McQueen, KL; Parham, P (2002). Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. Curr Opin Immunol 14(5):615-21.
- Medawar, PB (1944). The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. J Anat 78(Pt 5):176-99.
- Medawar, PB (1945). A second study of the behaviour and fate of skin homografts in rabbits. J Anat, Lond, 79, 157-176.
- Melter M; McMahon G; Fang J; Ganz P; Briscoe DM (1999). Current understanding of chemokine involvement in allograft transplantation. Pediatr Transplant (1):10-21.
- Michaëlsson, J; Achour, A; Salcedo, M; Kåse-Sjöström, A; Sundbäck, J; Harris, RA; Kärre, K (2000). Visualization of inhibitory Ly49 receptor specificity with soluble major histocompatibility complex class I tetramers. Eur J Immunol 30(1):300-7.
- Moretta, A; Biassoni, R; Bottino, C; Mingari, MC; Moretta, L (2000). Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. Immunol Today 21(5):228-34.
- Moretta, A; Biassoni, R; Bottino, C; Moretta, L (2000). Surface receptors delivering opposite signals regulate the function of human NK cells. Semin Immunol 12(2):129-38.
- Moretta, L; Mingari, MC; Pende, D; Bottino, C; Biassoni, R; Moretta, A (1996). The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. J Clin Immunol 16(5):243-53
- Mottram, PL; Raisanen-Sokolowski, A; Glysing-Jensen, T; Stein-Oakley, AN; Russell, ME (1998). Redefining peripheral tolerance in the BALB/c to CBA mouse cardiac allograft model: vascular and cytokine analysis after transient CD4 T cell depletion. Transplantation 66(11):1510-8.
- Nadeau, KC; Azuma, H; Tilney, NL (1995). Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokines RANTES and MCP-1. Proc Natl Acad Sci U S A 92(19):8729-33.
- Nagano H; Nadeau KC; Takada M; Kusaka M; Tilney NL (1997). Sequential cellular and molecular kinetics in acutely rejecting renal allografts in rats. Transplantation 63(8):1101-8.

- Nemlander, A; Saksela, E; Häyry, P (1983). Are "natural killer" cells involved in allograft rejection? Eur J Immunol 13(4):348-50.
- Newell, KA; He, G; Hart, J; Thistlethwaite, JR Jr (1997). Treatment with either anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibodies blocks alphabeta T cell-mediated rejection of intestinal allografts in mice. Transplantation 64(7):959-65.
- Obara, H; Nagasaki, K; Hsieh, CL; Ogura, Y; Esquivel, CO; Martinez, OM; Krams, SM (2005). IFN-gamma, produced by NK cells that infiltrate liver allografts early after transplantation, links the innate and adaptive immune responses. Am J Transplant (9):2094-103.
- Oberg, L; Johansson, S; Michaëlsson, J; Tomasello, E; Vivier, E; Kärre, K; Höglund, P (2004). Loss or mismatch of MHC class I is sufficient to trigger NK cell-mediated rejection of resting lymphocytes in vivo - role of KARAP/DAP12-dependent and -independent pathways. Eur J Immunol 34(6):1646-53.
- Ogura, Y; Martinez, OM; Villanueva, JC; Tait, JF; Strauss, HW; Higgins, JP; Tanaka, K; Esquivel, CO; Blankenberg, FG; Krams, SM (2001). Apoptosis and allograft rejection in the absence of CD8+ T cells. Transplantation 71(12):1827-34.
- Olsson-Alheim, MY; Sundbäck, J; Kärre, K; Sentman, CL (1999). The MHC class I molecule H-2Dp inhibits murine NK cells via the inhibitory receptor Ly49A. J Immunol 162(12):7010-4.
- Orbaek Andersen, H (1999). Heart allograft vascular disease: an obliterative vascular disease in transplanted hearts. Atherosclerosis 142(2): 243-63.
- O'Reilly, RJ; Brochstein, J; Collins, N; Keever, C; Kapoor, N; Kirkpatrick, D; Kernan, N; Dupont, B; Burns, J; Reisner, Y (1986). Evaluation of HLA-haplotype disparate parental marrow grafts depleted of T lymphocytes by differential agglutination with a soybean lectin and E-rosette depletion for the treatment of severe combined immunodeficiency. Vox Sang 51 Suppl 2:81-6.
- Orloff, MS; DeMara, EM; Coppage, ML; Leong, N; Fallon, MA; Sickel, J; Zuo, XJ; Prehn, J; Jordan, SC (1995). Prevention of chronic rejection and graft arteriosclerosis by tolerance induction. Transplantation 59(2):282-8.
- Oudot, J (1948). Transplantation rénale. Presse méd 56: 319
- Pattison, J; Nelson, PJ; Huie, P; von Leuttichau, I; Farshid, G; Sibley, RK; Krensky, AM (1994). RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney. Lancet 343(8891):209-11.
- Pearson, TC; Alexander, DZ; Winn, KJ; Linsley, PS; Lowry, RP; Larsen, CP (1994). Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. Transplantation 57(12):1701-6.
- Pedersen, BK; Beyer, JM (1986). A longitudinal study of the influence of azathioprine on natural killer cell activity. Allergy 41(4):286-9.
- Pende, D; Parolini, S; Pessino, A; Sivori, S; Augugliaro, R; Morelli, L; Marcenaro, E; Accame, L; Malaspina, A; Biassoni, R; Bottino, C; Moretta, L; Moretta, A (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor

- involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. J Exp Med 190(10):1505-16.
- Perico, N; Remuzzi, G (1997). Prevention of transplant rejection: current treatment guidelines and future developments. Drugs 54(4):533-70.
- Pessino, A; Sivori, S; Bottino, C; Malaspina, A; Morelli, L; Moretta, L; Biassoni, R; Moretta, A (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. J Exp Med 188(5):953-60.
- Petersson, E; Ostraat, O; Ekberg, H; Hansson, J; Simanaitis, M; Brodin, T; Dohlsten, M; Hedlund, G (1997). Allogeneic heart transplantation activates alloreactive NK cells. Cell Immunol 175(1):25-32.
- Petersson, E; Qi, Z; Ekberg, H; Ostraat, O; Dohlsten, M; Hedlund, G (1997). Activation of alloreactive natural killer cells is resistant to cyclosporine. Transplantation 63(8):1138-44.
- Piccirillo, CA; Shevach, EM (2001). Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. J Immunol 167(3):1137-40.
- Ploegh, HL (1998). Viral strategies of immune evasion. Science 280(5361):248-53.
- Prlic, M; Blazar, BR; Farrar, MA; Jameson, SC (2003). In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. J Exp Med 197(8):967-76.
- Qin, S; Cobbold, SP; Pope, H; Elliott, J; Kioussis, D; Davies, J; Waldmann, H (1993). "Infectious" transplantation tolerance. Science 259(5097):974-7.
- Raulet, DH; Vance, RE; McMahon, CW (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. Annu Rev Immunol 291-330.
- Riechmann L; Clark M; Waldmann H; Winter G (1988). Reshaping human antibodies for therapy. Nature 332(6162):323-7.
- Romagnani, C; Della Chiesa, M; Kohler, S; Moewes, B; Radbruch, A; Moretta, L; Moretta, A; Thiel, A (2005). Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. Eur J Immunol 35(8):2452-8.
- Roy, S; Barnes, PF; Garg, A; Wu, S; Cosman, D; Vankayalapati, R (2008). NK cells lyse T regulatory cells that expand in response to an intracellular pathogen. J Immunol 180(3):1729-36.
- Russell, PS; Chase, CM; Sykes, M; Ito, H; Shaffer, J; Colvin, RB (2001). Tolerance, mixed chimerism, and chronic transplant arteriopathy. J Immunol 167(10):5731-40.
- Salomon, B; Lenschow, DJ; Rhee, L; Ashourian, N; Singh, B; Sharpe, A; Bluestone, JA (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. Immunity 12(4):431-40.
- Sayegh, MH; Watschinger, B; Carpenter, CB (1994). Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. Transplantation 57(9):1295-302.

- Schuurman, HJ; Jambroes, G; Borleffs, JC; Slootweg, PJ; Meyling, FH; de Gast, GC (1988). Acute humoral rejection after heart transplantation. Transplantation 46(4): 603-5.
- Shapira, MY; Hirshfeld, E; Weiss, L; Zeira, M; Kasir, J; Or, R; Resnick, IB; Slavin, S (2005). Mycophenolate mofetil does not suppress the graft-versus-leukemia effect or the activity of lymphokine-activated killer (LAK) cells in a murine model. Cancer Immunol Immunother 54(4):383-8.
- Shelton, MW; Walp, LA; Basler, JT; Uchiyama, K; Hanto, DW (1992). Mediation of skin allograft rejection in scid mice by CD4+ and CD8+ T cells. Transplantation 54(2):278-86.
- Shevach, EM (2000). Suppressor T cells: Rebirth, function and homeostasis. Curr Biol 10(15):R572-5.
- Shevach, EM; McHugh, RS; Piccirillo CA; Thornton AM (2001). Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. Immunol Rev 182, 58–67
- Silver, ET; Gong, D; Hazes, B; Kane, KP (2001). Ly-49W, an activating receptor of nonobese diabetic mice with close homology to the inhibitory receptor Ly-49G, recognizes H-2D(k) and H-2D(d). J Immunol 166(4):2333-41.
- Silver, ET; Gong, DE; Chang, CS; Amrani, A; Santamaria, P; Kane KP (2000). Ly-49P activates NK-mediated lysis by recognizing H-2Dd. J Immunol 165(4):1771-81.
- Sivori, S; Vitale, M; Morelli, L; Sanseverino, L; Augugliaro, R; Bottino, C; Moretta, L; Moretta, A (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. J Exp Med 186(7):1129-36.
- Smith, HR; Karlhofer, FM; Yokoyama, WM (1994). Ly-49 multigene family expressed by IL-2-activated NK cells. J Immunol 153(3):1068-79.
- Smyth, MJ; Teng, MW; Swann, J; Kyparissoudis, K; Godfrey, DI; Hayakawa, Y (2006). CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. J Immunol 176(3):1582-7.
- Smyth, MJ; Thia, KY; Cretney, E; Kelly, JM; Snook, MB; Forbes, CA; Scalzo, AA (1999). Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. J Immunol 162(11):6658-62.
- Springer TA (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell 76(2):301-14.
- Stinn, JL; Taylor, MK; Becker, G; Nagano, H; Hasegawa, S; Furakawa, Y; Shimizu, K; Libby, P; Mitchell, RN (1998). Interferon-gamma-secreting T-cell populations in rejecting murine cardiac allografts: assessment by flow cytometry. Am J Pathol 153(5):1383-92.
- Storset, AK; Kulberg, S; Berg, I; Boysen, P; Hope, JC; Dissen, E (2004). NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. Eur J Immunol 34(3):669-76.

- Szot, GL; Zhou, P; Rulifson, I; Wang, J; Guo, Z; Kim, O; Newel, KA; Thistlethwaite, JR; Bluestone, JA; Alegre, ML (2001). Different mechanisms of cardiac allograft rejection in wildtype and CD28-deficient mice. Am J Transplant 1(1):38-46.
- Takahashi, T; Kuniyasu, Y; Toda, M; Sakaguchi, N; Itoh, M; Iwata, M; Shimizu, J; Sakaguchi, S (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. Int Immunol 10(12):1969-80.
- Tang, Q; Henriksen, KJ; Boden, EK; Tooley, AJ; Ye, J; Subudhi, SK; Zheng, XX; Strom, TB; Bluestone, JA (2003). Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol 171(7):3348-52.
- Taylor, PM; Rose, ML; Yacoub, MH; Pigott, R (1992). Induction of vascular adhesion molecules during rejection of human cardiac allografts. Transplantation 54(3): 451-7.
- Tertilt, CM (2002). Promotionarbeit: Untersuchungen zur Funktion von Zellen mit NK-Rezeptoren bei der Abstoßung allogener Herztransplantate durch CD28-defiziente Mäuse Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München
- Thornten, AM; Shevach EM (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J Exp Med 188, 2, 287–296
- Thornton, AM; Shevach, EM (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. J Immunol 164(1):183-90.
- Tilney, NL; Strom, TB; Bancewicz, J; Carpenter, CB (1975). Studies on living cells harvested from acutely rejecting and enhanced rat cardiac allografts. Surg Forum 26:349-50.
- Tomasello, E; Cant, C; Bühring, HJ; Vély, F; André, P; Seiffert, M; Ullrich, A; Vivier, E (2000). Association of signal-regulatory proteins beta with KARAP/DAP-12. Eur J Immunol 30(8):2147-56.
- Tortorella, D; Gewurz, BE; Furman, MH; Schust, DJ; Ploegh, HL (2000). Viral subversion of the immune system. Annu Rev Immunol 18:861-926.
- Trambley, J; Bingaman, AW; Lin, A; Elwood, ET; Waitze, SY; Ha, J; Durham, MM; Corbascio, M; Cowan, SR; Pearson, TC; Larsen, CP (1999). Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection. J Clin Invest 104(12):1715-22.
- Trauth, BC; Klas, C; Peters, AMJ; Matzuku, S; Möller, P; Falk, W; Debatin, KM; Krammer, PH (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science 245, pp. 301–305.
- Trinchieri, G (1989). Biology of natural killer cells. Adv Immunol 47:187-376.
- Uehara, S; Chase, CM; Kitchens, WH; Rose, HS; Colvin, RB; Russell, PS; Madsen, JC (2005). NK cells can trigger allograft vasculopathy: the role of hybrid resistance in solid organ allografts. J Immunol 175(5):3424-30.

- Valiante, NM; Lienert, K; Shilling, HG; Smits, BJ; Parham, P (1997). Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution. Immunol Rev 155:155-64.
- Vampa, ML; Norman, PJ; Burnapp, L; Vaughan, RW; Sacks, SH; Wong, W (2003). Natural killer-cell activity after human renal transplantation in relation to killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen mismatch. Transplantation 76(8):1220-8.
- Vankayalapati, R; Wizel, B; Weis, SE; Safi, H; Lakey, DL; Mandelboim, O; Samten, B; Porgador, A; Barnes, PF (2002). The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. J Immunol 168(7):3451-7.
- Varagunam, M; Yaqoob, MM; Döhler, B; Opelz, G (2009). C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation. N Engl J Med 360(9):874-80.
- Vella, JP; Vos, L; Carpenter, CB; Sayegh, MH (1997). Role of indirect allorecognition in experimental late acute rejection. Transplantation 64: 1823-1828.
- Vincenti, F; Larsen, C; Durrbach, A; Wekerle, T; Nashan, B; Blanche, G; Lang, P; Grinyo, J; Halloran, PF; Solez, K; Hagerty, D; Levy, E; Zhou, W; Natarajan, K; Charpentier, B; Belatacept Study Group (2005). Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. N Engl J Med 353(8):770-81.
- Vitale, M; Bottino, C; Sivori, S; Sanseverino, L; Castriconi, R; Marcenaro, E; Augugliaro, R; Moretta, L; Moretta, A (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. J Exp Med 187(12):2065-72.
- Vogelstein, B; Gillespie, D (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci U S A 76(2):615-9.
- Wald, O; Weiss, ID; Wald, H; Shoham, H; Bar-Shavit, Y; Beider, K; Galun, E; Weiss, L; Flaishon, L; Shachar, I; Nagler, A; Lu, B; Gerard, C; Gao, JL; Mishani, E; Farber, J; Peled, A (2006). IFN-gamma acts on T cells to induce NK cell mobilization and accumulation in target organs. J Immunol 176(8):4716-29.
- Williams, CS (1923). Some observations on the length of survival and function of homogenous kidney transplants. Preliminary report. J Urol 10: 275
- Wilson, DB; Nowell, PC (1971). Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. V. Tempo and specificity of the proliferative response and the number of reactive cells from immunized donors. J Exp Med 133(3):442-53.
- Wong, S; Freeman, JD; Kelleher, C; Mager, D; Takei, F (1991). Ly-49 multigene family. New members of a superfamily of type II membrane proteins with lectin-like domains. J Immunol 147(4):1417-23.
- Xia, J; Liu, W; Hu, B; Tian, Z; Yang, Y (2010). IL-15 promotes regulatory T cell function and protects against diabetes development in NK-depleted NOD mice. Clin Immunol 134(2):130-9.
- Yokoyama, WM (1995). Hybrid resistance and the Ly-49 family of natural killer cell receptors. J Exp Med 182(2):273-7

- Yokoyama, WM; Plougastel, BF (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. Nat Rev Immunol 3(4):304-16.
- Yokoyama, WM; Seaman, WE (1993). The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. Annu Rev Immunol 11:613-35.
- Yu, YY; George, T; Dorfman, JR; Roland, J; Kumar, V; Bennett, M (1996). The role of Ly49A and 5E6(Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine natural killer cells against normal T cell blasts. Immunity 4(1):67-76.
- Zand, MS; Vo, T; Pellegrin, T; Felgar, R; Liesveld, JL; Ifthikharuddin, JJ; Abboud, CN; Sanz, I; Huggins, J (2006). Apoptosis and complement-mediated lysis of myeloma cells by polyclonal rabbit antithymocyte globulin. Blood 107(7):2895-903.
- Zeicher, D; Li, Q; Oberbarnscheidt, MH; Demetris, AJ; Shlomchik, WD; Rothstein, DM; Lakkis FG (2010). NK cells delay allograft rejection in lymphopenic hosts by downregulating the homeostatic proliferation of CD8+ T cells. J Immunol 184(12):6649-57.
- Zhu, P; Chen, YF; Chen, XP; Li, D; Cheng, Q; Huang, ZY; Zhang, WG; Xiao, ZY (2008). Mechanisms of survival prolongation of murine cardiac allografts using the treatment of CTLA4-Ig and MR1. Transplant Proc 40(5):1618-24.

III) ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Antigenpräsentierenden Zellen
bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4
DC	Dendritische Zelle
DNA	deoxyribonucleic acid
FCS	fetal calf serum
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde(n)
HLA	human leukocyte antigen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor Tyrosin Based Activating Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosin Based Inhibitory Motif
kb	Kilobasen
KIR	killer cell immunglobuline-like receptor
MACS	magnetic-activated cell sorting
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NTP	Nukleosid-Triphosphat
PBS	phosphate-bufferer saline
RI	RNAse-Inhibitor
RNA	ribonucleic acid
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
Treg	regulatorische T-Zelle