

Aus der Augenklinik des
Universitätsklinikum Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. H. Foerster

**Immunhistochemische Befunde zum Einfluß immunsuppressiver Therapie
nach perforierender Keratoplastik am Rattenauge**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Anne-Christine Karow
aus Berlin

INHALT

EINLEITUNG	6
1. HORNHAUTTRANSPLANTATION	6
1.1 Kurzer geschichtlicher Überblick	6
1.2 Hornhauttransplantation heute	7
1.2.1 Indikationen zur Keratoplastik	7
1.2.2 Risikofaktoren - Hochrisikokeratoplastik	7
2. DIE PATHOGENESE DER ABSTOßUNGSREAKTION	8
2.1 Grundlegendes	8
2.1.1 Der Major Histocompatibility Complex (MHC)	8
2.1.2 Antigen-präsentierende Zellen (APC)	10
2.1.3 Minore Histokompatibilitätsantigene	11
2.1.4 Effektormechanismen der Abstoßungsreaktion	11
2.2 Das okuläre Immunsystem - Besonderheiten der Immunologie des Auges	12
2.2.1 Immunkompetente Zellen in der Hornhaut	12
2.2.2 Histokompatibilitätsantigene in der Hornhaut	13
2.2.3 Das Immunprivileg des Auges - ACAID	15
3. MAKROPATHOLOGIE UND HISTOLOGIE DER TRANSPLANTATABSTOßUNG	16
4. PRÄVENTION UND BEHANDLUNG DER ABSTOßUNG IN DER KLINIK	17
5. TIERMODELLE – KANINCHEN, RATTE, MAUS	18
6. EXPERIMENTELLE THERAPIEFORMEN	20
6.1 Verschiedene Prinzipien der Immunsuppression	21
6.2 Kleinmolekulare Immunsuppressiva	22
6.2.1 Cyclosporin A	22
6.2.2 Tacrolimus (FK 506), Sirolimus (Rapamycin)	24
6.2.3 Leflunomid	24
6.3 Monoklonale Antikörper	26
6.3.1 Allgemeines zu Wirkung und Anwendung	26
6.3.2 Anti-CD4-Antikörper	27
7. FRAGESTELLUNG	28

MATERIAL UND METHODEN	29
1. TIERE	29
2. MEDIKAMENTE	29
3. OPERATIONS-METHODE	29
4. EINTEILUNG DER BEHANDLUNGSGRUPPEN	30
5. POSTOPERATIVE UNTERSUCHUNG DER AUGEN	31
6. ERSTELLUNG EINER KINETIK DER ALLOGRAFTREAKTION	32
7. AUFARBEITUNG DER AUGEN	32
8. APAAP UND ANDERE IMMUNHISTOCHEMISCHE VERFAHREN	33
9. DARSTELLUNG DER DAS TRANSPLANTAT INFILTRIERENDEN ZELLPOPULATIONEN MIT DER APAAP-METHODE	35
10. KONTROLLEN	36
11. AUSWERTUNG DER GEWEBSSCHNITTE	36
ERGEBNISSE	38
1. AUS DER STUDIE AUSGESCHLOSSENE TIERE	38
2. NORMALE (NICHT OPERIERTE) RATTENAUGEN	38
3. HORNHAUTTRANSPLANTIERTE AUGEN	38
3.1 Allgemeine Beobachtungen	38
3.2 Syngene Transplantation	39
3.3 Allogene Transplantation	41
3.3.1 Unbehandelte Tiere	41
3.3.2 Allogene Transplantation - Behandlung mit Cyclosporin A	44
3.3.3 Allogene Transplantation - Behandlung mit Leflunomid	46
3.3.4 Allogene Transplantation - Behandlung mit RIB 5/2 + Cyclosporin A	49
DISKUSSION	54
ZUSAMMENFASSUNG	71
LITERATURVERZEICHNIS	72

DISKUSSION

Bezüglich der häufigsten Ursache für das Scheitern einer Keratoplastik, der Transplantatabstoßung auf Grund von Histoinkompatibilität, sind trotz der langjährigen Praxis und der intensiven Forschung auf diesem Gebiet noch einige wesentliche Fragen offen. Der Mechanismus der Abstoßungsreaktion ist noch nicht vollständig verstanden, und die für die Abstoßung verantwortliche Zellpopulation nicht mit Sicherheit identifiziert. Mit diesem Wissen wäre die Entwicklung spezifischer, und damit nebenwirkungsärmerer Präventions- und Therapiestrategien der möglich.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich immunhistologisch nachweisen, daß die Behandlung von Ratten mit einem nicht depletierenden, also das CD4-Molekül blockierenden Anti-CD4-Antikörper nach Keratoplastik die Einwanderung von Zellen in die transplantierte Hornhaut und damit die Abstoßung derselben deutlich verzögern, wenn nicht verhindern kann.

Auch in dieser Arbeit findet sich bestätigt, daß vor der eigentlichen Allograftreaktion eine auch in den syngenem Transplantaten nachzuweisende unspezifische Entzündungsreaktion auf das Operationstrauma abläuft, die möglicherweise entscheidend zu Initiation der eigentliche Abstoßungsreaktion beiträgt.

Neben der zentralen Beobachtung über die Wirkung von Anti-CD4-Antikörpern auf die Transplantatabstoßung findet sich in den Ergebnissen dieser Arbeit eine Beobachtung bestätigt, die zwar nicht neu, aber doch für die Genese der Abstoßungsreaktion wichtig, weil vermutlich initiiierend, ist.

Mehrere andere Autoren haben bereits beschrieben, daß der eigentlichen Allograftreaktion eine unspezifische Entzündung als Reaktion auf das Operationstrauma vorausgeht, die auch nach syngener Transplantation nachzuweisen ist [Ayliffe et al. (1992); Holland, E.J. et al. (1994)].

Es findet sich sowohl in den syngenem als auch den allogenen Transplantaten zu Beginn eine geringgradige Gefäßneubildung in der Empfängerhornhaut und eine leichte Infiltration der Empfängerhornhaut und des Transplantats mit polymorphkernigen Zellen und Lymphozyten, das Endothel bleibt dabei intakt [Callanan, D.G. et al. (1989); Gronemeyer, U. et al. (1978)]. Diese Reaktion kommt beim syngenem Transplantat nach etwa einer Woche von selbst zum Stillstand. Das Infiltrat und die Gefäße verschwinden. Es findet sich lediglich bei Belassen

der Nähte eine mehr oder weniger ausgeprägte Fremdkörperreaktion um die Fäden [Gronemeyer, U. et al. (1978); Holland, E.J. et al. (1991)].

Das Bild bei der allogenen Transplantation gleicht zu Beginn dem der syngenen. Dann aber nimmt bei den Augen, die eine Abstoßungsreaktion durchlaufen, die Vaskularisation der Hornhaut deutlich zu, und die Gefäße dringen ins Transplantat ein. Es folgt die eingangs beschriebene Entzündung, die zur Zerstörung des Transplantates führt.

Dies läßt sich auch in dieser Arbeit nachweisen. Bis zum 8./9. Tag post op überwiegen hier im Transplantat die CD11⁺ Zellen. Von diesen exprimieren nicht alle RT1B, d.h. es handelt sich z.T. um RT1B-exprimierende Makrophagen, z.T. um polymorphkernige Granulozyten.

Mehrere Autoren gehen davon aus, daß diese zu Beginn auftretende Entzündungsreaktion, die sich durch Vergleich syngener und allogener Transplantate als unspezifische Reaktion auf das Operationstrauma von der späteren Allograftreaktion abgrenzen läßt, die Allograftreaktion triggert [Ayliffe et al. (1992); Gronemeyer, U. et al. (1978); Holland, E.J. et al. (1991); Larkin, D.F.P. (1994); Pleyer, U. (1997)].

Die unspezifische Entzündungsreaktion überkommt die Schutzmechanismen, die das Immunprivileg des Auges ausmachen.

Angesichts der besonderen Immunologie des Auges wird die Bedeutung dieser unspezifischen Entzündung für die Allograftreaktion deutlich:

Das Auge hat in gesundem Zustand ein immunologisches Privileg inne, durch das es vor dem Einbüßen der Sehkraft durch Entzündung geschützt wird.

Allerdings ist dieses Immunprivileg offensichtlich kein stabiler Zustand, sondern eine besondere, aktiv aufrechterhaltene Reaktionslage des Organismus, die gestört bzw. aufgehoben werden kann, so daß dann Entzündungs- und auch Abstoßungsreaktionen ganz ähnlich wie an anderen Stellen des Körpers ablaufen.

Das Immunprivileg basiert, wie eingangs erwähnt, einerseits auf einigen anatomischen Besonderheiten im Auge. Am gesunden Auge existiert eine Blut-Kammerwasser-Schranke, die die Vorderkammer von Zellen und Proteinen aus dem Blut abschirmt.

Die gesunde Hornhaut exprimiert ferner wenig MHC-Klasse I-Antigene und ist arm an APC, im Zentrum sogar fast frei davon, so daß auch fast kein MHC-Klasse II in der Hornhaut exprimiert wird.

Andererseits generiert der Organismus nach Antigenkontakt über die Vorderkammer des Auges eine abweichende Immunantwort, Anterior Chamber Associated Immune Deviation (ACAID) [Nieder Korn, J. et al. (1981)]. Diese Reaktion ist bedingt durch ein besonderes Microenvironment innerhalb der Augenvorderkammer.

Einen entscheidenden Anteil daran hat das Kammerwasser mit den darin enthaltenen Zytokinen, darunter Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und IL-1a- sowie IL-1-Rezeptorantagonisten [Grisanti, S. (1998); Streilein, J.W. et al. (1997); Streilein, J.W. et al. (1999), Yamada, J. et al. (1998)]. Diese Zytokine bewirken eine Funktionsänderung von ins Auge gelangenden T-Zellen, bzw. der im Auge vorhandenen APC. IL-1-Rezeptorantagonist hindert offensichtlich Langerhanszellen am Einwandern in die zentralen Hornhautanteile und kann so die Erkennung von Fremdanitigenen verhindern [Streilein, J.W. et al. (1999); Yamada, J. et al. (1998)].

Im Milieu des Kammerwassers können CD4⁺ T-Zellen kein IL-2 und IFN- γ sezernieren, so daß sich die CD8⁺ Vorläuferzellen nicht zu reifen zytotoxischen T-Zellen differenzieren können und auch die DTH-Reaktion ausbleibt [Streilein, J.W. et al. (1997)]. Die APC werden durch dieses Milieu in ihren antigenpräsentierenden Eigenschaften verändert. Sie können außerdem das Auge nur über den Schlemm'schen Kanal direkt in die Blutbahn verlassen, und gelangen so in die Milz und nicht wie normalerweise über die Lymphabflußwege in einen Lymphknoten.

Die veränderte Antigenpräsentation bewirkt in der Milz die Produktion von v.a. CD8⁺ T-Zellen, einerseits Präkursoren zytotoxischer T-Zellen und andererseits regulatorische, die ihrerseits TGF- β produzieren und so die Differenzierung von CD4⁺ Helferzellen und zu CD8⁺ zytotoxischen Zellen unterbinden [Grisanti, S. (1998); Streilein, J.W. et al. (1997)].

Durch diese besondere immunologische Situation am Auge sind, zumindest theoretisch, auch Hornhauttransplantate vor Übergriffen des Immunsystems geschützt. Zumindest bei „low risk“- Transplantationen, bei denen das Auge nicht durch Entzündung das Immunprivileg bereits eingebüßt hat, ist dies sicher tatsächlich gegeben [Streilein, J.W. et al. (1999)].

Dieses sehr fein regulierte System ist aber nicht stabil. Einer Störung durch starke Entzündungsreize hält es nicht stand. Durch Vaskularisierung der Hornhaut entfällt die Blut-Kammerwasserschranke, Entzündung hat die Einwanderung von dendritischen Zellen in die zentralen Anteile der Hornhaut zur Folge.

Auch ACAID ist nicht unumstößlich. Ein Zusammenbruch dieser Reaktionslage zieht eine „normale“ Immunreaktion auf Fremdartigene nach sich. So werden bei Entzündungen im Bereich der Vorderkammer verschiedene Zytokine produziert, die die Produktion von TGF- β hemmen (u.a. IL-1 β , IFN- γ), so daß das Kammerwasser seine immunmodulatorischen Eigenschaften verliert und ACAID nicht ausgebildet wird [Jager, M.J. et al. (1995)]. Eine vermehrte Anzahl von Langerhanszellen (APC) in der Hornhaut verhindert die Ausbildung von ACAID auf noch nicht geklärte Art und Weise.

Dies hat einerseits Implikationen für die Entstehung von sogenannten „high-risk“-Keratoplastiken. Verschiedene Autoren haben demonstriert, daß der Grad der Vaskularisation der Hornhaut von großer Bedeutung für das Transplantatüberleben nach Keratoplastik ist [Council of Scientific Affairs (1988); Khodadoust, A.A. und Silverstein, A.M. (1972); Williams, K.A. und Coster, D.J. (1985)]. Ebenso entscheidend ist die Präsenz von APC in den zentralen Hornhautanteilen. Das gilt für eine vermehrte Anzahl APC entweder im Transplantat oder in der Empfängerhornhaut [Callanan, D. et al. (1988); Jager, M.J. et al. (1995); Katami, M. (1995)].

Andererseits erscheint bei Betrachtung dieser labilen Situation die oben diskutierte unspezifische Entzündung, die unabhängig von Gewebsunverträglichkeiten auf das Operationstrauma folgt, umso beachtenswerter. Wahrscheinlich werden durch die hier stattfindende, wenn auch geringgradige, Vaskularisation sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch die Gewebsverletzung die oben beschriebenen Schutzmechanismen des Auges so gestört, daß sie unwirksam werden.

Die Rolle der klinisch verwendeten Steroide liegt unter anderem in der Unterdrückung der unspezifischen Entzündungsreaktion auf das Operationstrauma.

Die wichtige Rolle der unspezifischen Entzündungsreaktion bei der Immunreaktion weist indirekt auch auf einen Aspekt der Wirkung der klinisch breit angewendeten Steroide hin, die in dieser Arbeit keine Anwendung fanden. Diese sind auf Grund ihrer breiten immunsuppressiven Wirkung unter anderem in der Lage, bereits diese unspezifische initiale Entzündung zu unterdrücken und so eine Immunreaktion weniger wahrscheinlich zu machen.

Auf Grund der initialen unspezifischen Entzündung im Transplantat mit Überwiegen von Makrophagen und polymorphkernigen Granulozyten wäre zur Verhinderung der Abstoßung auch eine Störung dieser Zellen denkbar, z.B. mit Hilfe von Chemokinen.

Dagegen wurde bisher kaum erforscht, ob den in dieser Frühphase im Transplantat ebenfalls vorhandenen polymorphkernigen Granulozyten eine besondere Rolle im Rahmen der Allograftreaktion zufällt. Eine Möglichkeit, selektiv auf diese einzuwirken, bieten vielleicht die erst vor recht kurzer Zeit charakterisierten Chemokine. Es handelt sich dabei um eine Zytokinfamilie, die chemotaktische Wirkung hat und in der Umgebung von Entzündung den Leukozyten das Signal zur Extravasation ins Gewebe vermittelt. Diese Familie besteht aus mehreren Untergruppen, von denen mindestens eine offenbar gezielt auf polymorphkernige Granulozyten wirkt [Luster, A.D. (1998)]. Durch eine Blockade der entsprechenden Chemokine könnten diese unter Umständen von der Einwanderung ins Gewebe abgehalten und so ihre Rolle in der Allograftreaktion untersucht werden. Allerdings gibt es bisher auch keinen Hinweis auf eine Beteiligung neutrophiler Granulozyten an der Immunreaktion.

Die klinisch beobachtete, relativ geringe Verzögerung der Abstoßung durch Cyclosporin A und Leflunomid ließ sich immunhistologisch nicht nachweisen.

Die klinisch in Voruntersuchungen beobachtete Verzögerung der Abstoßung in der mit CyA allein behandelten und in der mit LF behandelten Gruppe [Coupland, S.E. et al. (1995)] ließ sich in dieser Arbeit histologisch bzw. immunhistologisch nicht bestätigen. Das histologische Bild entsprach schon am 13.Tag post operationem (post op) dem einer Abstoßungsreaktion, also zum gleichen Zeitpunkt wie bei den unbehandelten Tieren [Karow, A.-C. et al. (1995)].

In mehreren Studien ist belegt, daß systemisch gegebenes CyA auch bei Hochrisikopatienten die Abstoßung verhindert [Pleyer et al. (1998); Hill, J.C. (1994)]. Die in dieser Arbeit verwendete Dosierung verzögert auch am Rattenmodell signifikant die Abstoßung, allerdings in anderer Spender-Empfänger-Kombination [Bouchard, C.S. et al. (1995)]. Es stellt sich also die Frage, warum CyA jetzt keine Verzögerung der Abstoßung bewirken konnte. Die in den vorhergehenden Untersuchungen erreichte Verzögerung der Abstoßung bei dieser Spender-Empfänger-Kombination war zwar signifikant, betrug allerdings nur vier Tage [Coupland, S.E. et al. (1994)]. Ebenso gering war die Verzögerung durch die Behandlung mit LF.

Die kleinen Fallzahlen pro Untergruppe (s.o., Material und Methoden) reichen offensichtlich nicht aus um diesen Unterschied deutlich werden zu lassen.

Durch Behandlung mit dem Anti-CD4-Antikörper RIB 5/2 ließ sich bei vielen Tieren im Beobachtungszeitraum die massive Einwanderung von Zellen ins Transplantat und damit die Abstoßungsreaktion verhindern.

Bei den mit RIB 5/2 plus CyA behandelten Tieren zeigte sich ein deutlicher Behandlungserfolg. Ab dem 12./13. Tag post op fanden sich zu allen Vergleichszeitpunkten im Mittel weniger Zellen als in allen anderen Behandlungsgruppen, (s. Grafik 7 u. 8), d.h. durch die Therapie mit dem Anti-CD4-Antikörper ließ sich die Abstoßungsreaktion im Beobachtungszeitraum bei vielen Tieren (s.u.) verhindern.

Einer Klärung bedarf der vorübergehende Anstieg der Zellzahl zum 25. Tag post operationem. Bei Betrachtung der Einzelwerte zeigt sich, daß die Transplantate der am 25. Tag getöteten Tiere unterschiedliche Schicksale durchliefen. Einige wurden deutlich mehr infiltriert als andere.

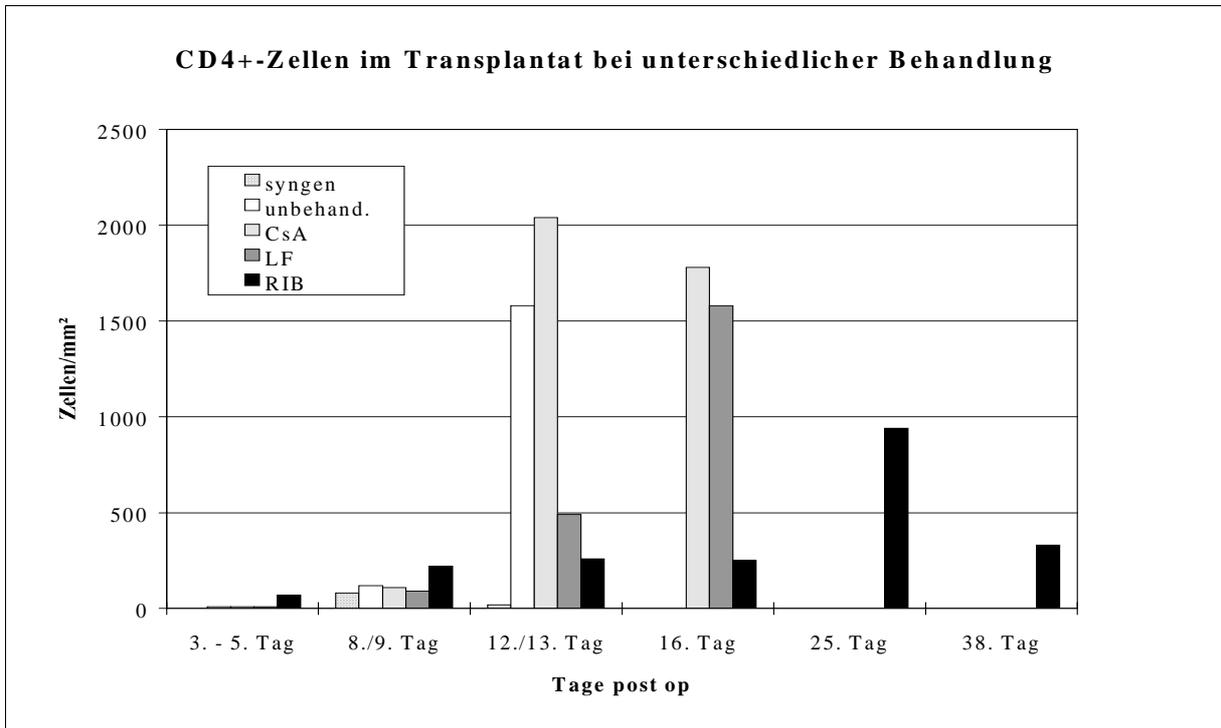
Die Behandlung mit RIB 5/2 induziert offenbar bei einem Teil der Tiere eine Toleranzentwicklung, bei anderen dagegen wird lediglich die Abstoßung verzögert.

Dies entspricht den Ergebnissen vorhergehender Untersuchungen, in denen diese Therapie bei einigen Tieren eine Toleranzentwicklung mit Transplantatüberleben über 100 Tage, bei anderen dagegen nur eine Verzögerung der Abstoßungsreaktion bewirkt hat [Coupland, S.E. et al. (1995)]. Offenbar waren unter den am 25. Tag post op getöteten Tieren mehrere, deren Transplantate stärker infiltriert wurden im Vergleich zu der Gruppe am 38. Tag, wo sich wieder ein deutlich niedrigerer Mittelwert ergibt.(s. Grafik 9 u. 10).

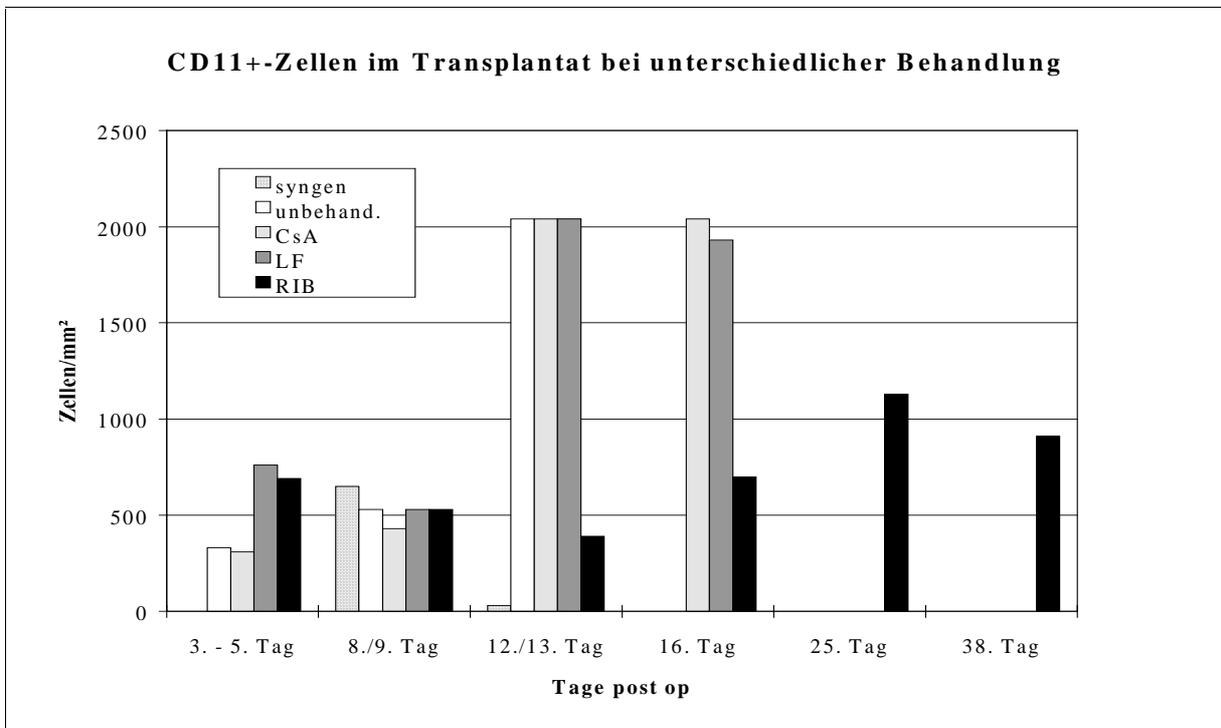
Bei der recht großen Zahl von Untergruppen in dieser Arbeit ist die Fallzahl in den einzelnen Gruppen zu klein, um zwischen den Tieren mit dauerhafter Toleranz und denen, bei denen lediglich die Abstoßung verzögert ist, zu unterscheiden. In den Mittelwerten spiegeln sich demzufolge beide Verläufe wieder.

Augenfällig ist außerdem, daß dieser Anstieg der Zellzahl auf das Absetzen der Antikörpergabe am 15. Tag folgt. Das heißt, eine Verzögerung der Abstoßung wurde durch die Antikörpergabe in jedem Fall erreicht.

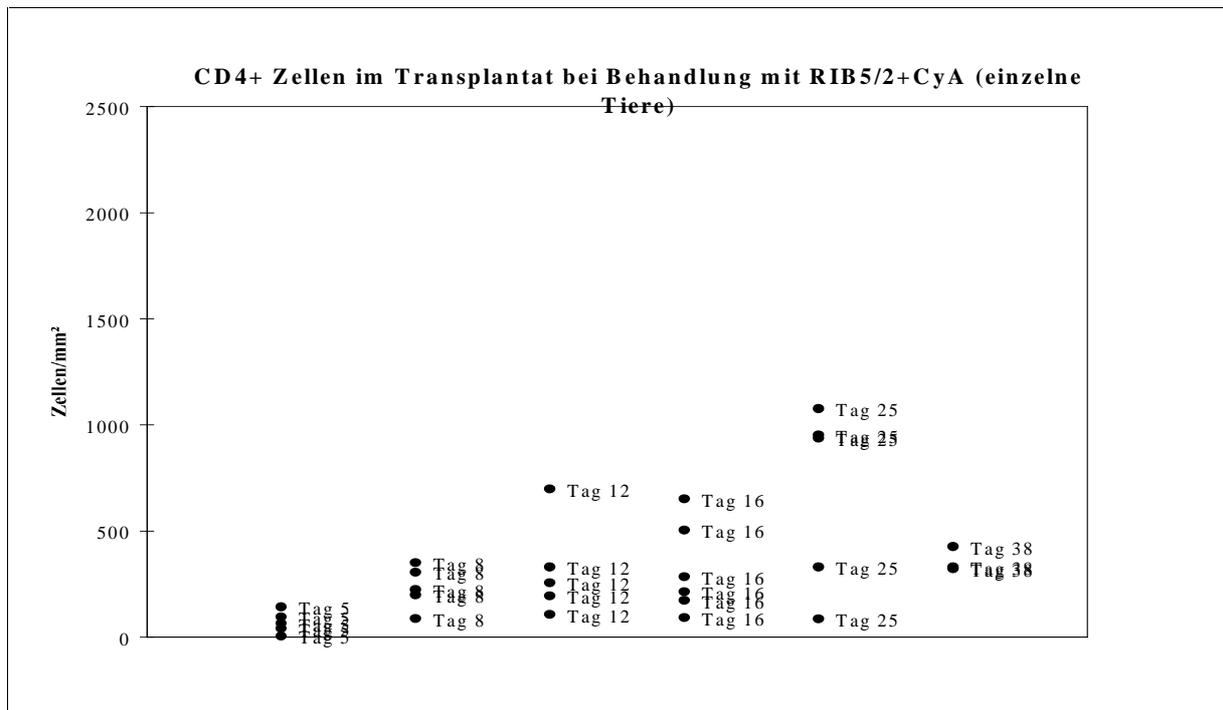
Möglicherweise besteht eine die Abstoßung verzögernde Wirkung der Antikörper für die Zeit der Gabe, die nicht mit der tolerogenen Wirkung gleichzusetzen ist.



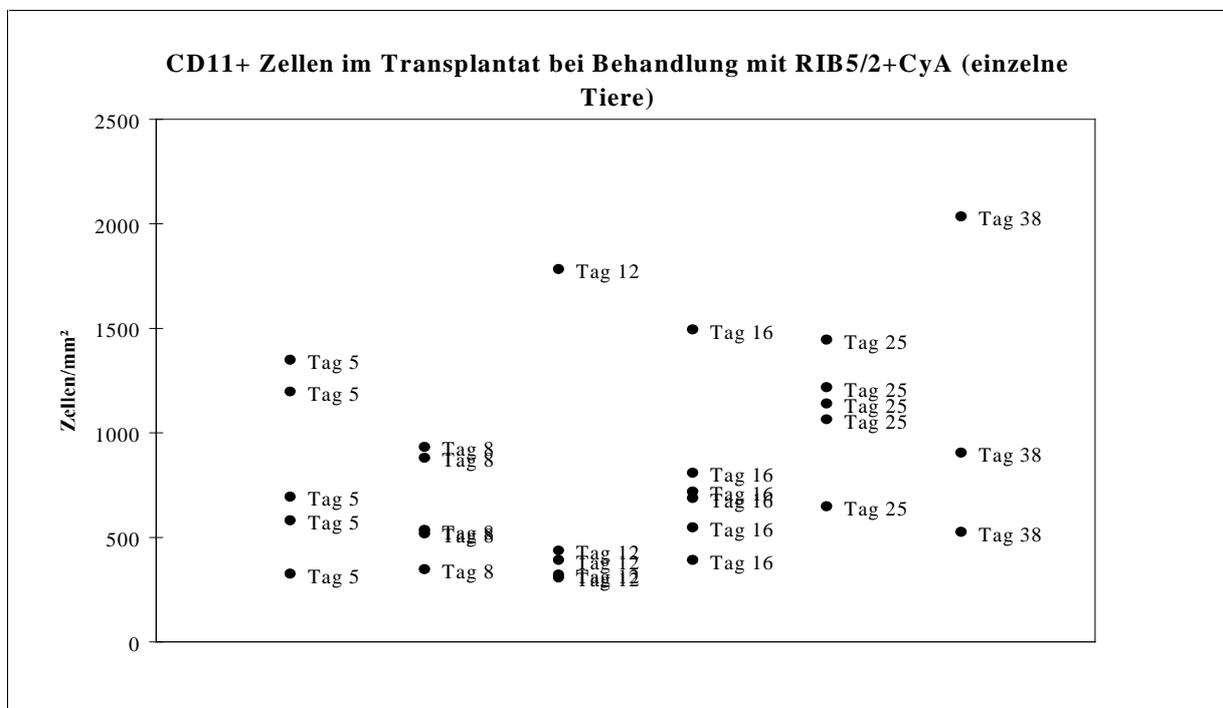
Grafik 7: Die Anzahl der CD4⁺ Zellen im Transplantat steigt bei allen Behandlungsgruppen spätestens zum 12./13. Tag post op. steil an, während sie in der mit RIB 5/2 behandelten Gruppedurchgehend niedrig bleibt, was den Erfolg dieser Behandlung zusammen mit dem geringen Anstieg in den anderen untersuchten Populationen belegt.



Grafik 8: Auch die Anzahl der CD11⁺ Zellen, die nicht direkt durch den Anti-CD4-Antikörper beeinflusst werden, bleibt in der mit RIB 5/2 behandelten Gruppe deutlich hinter der der anderen Gruppen zurück.



Grafik 9: Die einzelnen Zellzahlenwerte der mit RIB 5/2 behandelten Tiere zeigen, daß einige Transplantate wesentlich stärker infiltriert werden als andere. Dies legt nahe, daß eine Toleranzinduktion durch diese Therapie bei einigen Tieren gelingt, bei anderen dagegen nicht.



Grafik 10: Auch bei Untersuchung der CD11⁺ Zellen zeigt sich der z.T. sehr deutliche Unterschied zwischen den einzelnen Tieren hinsichtlich der Ausprägung der Infiltration des Transplantats, der den zwischenzeitlichen Anstieg der Zellzahl am 25. Tag als Mischung aus den Zahlen der stärker und weniger stark infiltrierten Transplantaten erklärt.

Anti-CD4-Antikörper wirken abhängig von ihrem Isotyp entweder durch Zerstörung ihrer Zielzellen, oder durch Blockade des CD4-Moleküls. Durch eine veränderte Signaltransduktion nach Blockade werden die T-Zellen tolerant.

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper RIB 5/2 übt seine Wirkung auf die Zielzelle wie die meisten heute experimentell verwendeten Anti-CD4-Antikörper durch Blockade des CD4-Moleküls aus, ohne seine Zielzelle zu zerstören [Lehmann, M. et al. (1992)]. Andere Anti-CD4-Antikörper zerstören ihre Zielzelle nach Bindung an dieselbe.

Diese unterschiedlichen Auswirkungen sind wahrscheinlich abhängig vom jeweiligen Isotyp der Antikörper: Depletierende, d.h. die Zerstörung ihrer Zielzelle bewirkende Antikörper scheinen meist dem Isotyp IgG2b anzugehören, die Antikörper des Isotyps IgG2a dagegen sind offensichtlich meist nicht-depletierend [Darby, C.R. et al. (1992)], d.h. binden, ohne ihre Zielzelle zu zerstören.

Man ging zu Beginn des experimentellen Einsatzes dieser Antikörper davon aus, daß die CD4⁺ Zellen zerstört werden müßten, um ihre Rolle innerhalb der Immunreaktion nicht mehr wahrnehmen zu können, und verwendete ausschließlich depletierende anti-CD4-Antikörper [Cobbold, S.P. et al. (1984); Herbert, J. und Roser, B. (1988)]. Dies ging mit einer z.T. sehr langanhaltenden Depletion der CD4⁺ Zellen und damit einer unkontrollierbaren Immunsuppression einher.

Dann stellte sich heraus, daß die Depletion nicht Voraussetzung für die durch die Antikörper erreichte Wirkung ist, sondern daß dafür eine Bindung nicht-depletierender Antikörper an das CD4-Molekül ausreicht bzw. z.T. sogar wirkungsvoller ist als die Zelledepletion [Cobbold, S.P. et al. (1992); Darby, C.R. et al. (1992); Waldmann, H. und Cobbold, S. (1993)].

Durch die Blockade des CD4-Moleküls wird die Signaltransduktion innerhalb der T-Zelle verändert. Dies führt im Idealfall zu Toleranzentwicklung gegenüber den Antigenen, die dem Körper während der Blockade durch die Antikörper zugeführt werden (Genauerer s.u.). Diese Toleranz ist von Dauer, da die für die Spenderantigene spezifischen Zellen durch die veränderte Signaltransduktion sozusagen auf Toleranz programmiert werden. Andererseits sind aber spätere Immunprozesse ungestört, da die Antikörper nur in einem recht kurzen Zeitraum um die Transplantation herum appliziert werden müssen, um den gewünschten Effekt zu erzielen.

Die Transplantattoleranz stellt eine Reaktionslage reifer T-Lymphozyten in der Peripherie dar, so daß diese keine Abstoßungsreaktion, sondern im Gegenteil eine aktive Protektion ihres spezifischen Antigens bewirken.

Der Wirkungsmechanismus nicht-depletierender anti-CD4-Antikörper ist noch nicht bis ins Detail bekannt. Ihr Einsatz in der Forschung hat aber in den letzten Jahren zu neuen Erkenntnissen über die Transplantattoleranz geführt.

Es hat sich herausgestellt, daß bei der Entwicklung von Transplantattoleranz, anders als bei der Toleranz gegen Selbst-Antigene, vor allem Mechanismen der peripheren Toleranz, also thymusunabhängige Mechanismen, eine Rolle spielen [Cobbold, S.P. et al. (1992); Cobbold, S.P. et al. (1996); Charlton, B. et al. (1994)].

Die periphere Toleranz ist eine Reaktionslage, in die reife T-Lymphozyten in der Peripherie unter bestimmten Bedingungen überführt werden können. Sie durchlaufen dann nach Erkennung ihres spezifischen Antigens nicht die Schritte, die eine Abwehrreaktion gegen das entsprechende Antigen hervorrufen, sondern sorgen im Gegenteil aktiv dafür, daß dieses Antigen auch von anderen T-Zellen der gleichen Spezifität nicht mehr angegriffen wird.

Die Behandlung mit Anti-CD4-Antikörpern ist eine Möglichkeit, diese Reaktionslage zu induzieren. Auch Antikörper, die gegen andere an der Zelladhäsion beteiligte Oberflächenmoleküle, wie ICAM-1 und LFA-1, gerichtet sind, sind dazu in der Lage [Yamagami, S. et al. (1995); He, Y.G. et al. (1994)]. Diese Moleküle werden aber, anders als das CD4- und das CD8-Molekül, von verschiedenen Zellpopulationen exprimiert. Durch Anwendung von Anti-CD4- und -CD8-Antikörpern kann man dagegen einzelne Zellpopulationen gezielt beeinflussen, deren Rolle in der Abstoßungsreaktion noch dazu von großem Interesse ist.

Der Mechanismus der Toleranzentwicklung nach Blockade des CD4-Moleküls ist noch nicht bekannt; diskutiert werden die Theorien der T-Zellanergie und der Immundeavitation, die sich möglicherweise ergänzen.

Es gibt verschiedene Theorien darüber, durch welche Mechanismen Anti-CD4-Antikörper eine Toleranzentwicklung bei T-Zellen bewirken. Denkbar sind folgende, sich möglicherweise ergänzende Varianten: Depletion der T-Zellen, T-Zellanergie mit Immunkompetition oder Immundeavitation [Cobbold, S.P. et al. (1992); Cobbold, S.P. et al. (1996)].

Bei der Verwendung depletierender Anti-CD4-Antikörper ist der Mechanismus eindeutig, sie zerstören ihre Zielzellen. Die dadurch erreichte Toleranz ist aber zumindest bei Hauttrans-

plantaten nicht von Dauer, da offenbar aus dem Thymus nachrückende T-Zellen das Transplantat letztlich doch abstoßen [Cobbold, S.P. et al. (1992)].

Nicht depletierende Anti-CD4-Antikörper blockieren lediglich das CD4-Molekül und stören so seine Funktion. Durch welchen Mechanismus die CD4⁺ Lymphozyten dann tolerant werden, ist aber noch nicht beantwortet. Im wesentlichen werden zwei verschiedene Theorien verfolgt, die möglicherweise auch miteinander verknüpft werden können.

Die Theorie der Immundeavation sieht ein Überwiegen von tolerogenen Zytokinen als ursächlich für die Toleranz an, produziert durch Th2-Zellen, die durch die Blockade des CD4-Moleküls über Th1-Zellen dominieren.

Die Theorie der Immundeavation geht davon aus, daß durch die Blockade des CD4-Moleküls bei der Antigenerkennung die T-Helfer-2(Th2)-Zellen vor den T-Helfer-1(Th1)-Zellen favorisiert werden, bzw. sich T-Helfer-0-Zellen vor allem zu Th2-Zellen entwickeln.

Diese beiden T-Zellpopulationen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Zytokinprofils und damit in ihrer Rolle im Immunsystem. Th1-Zellen sind für die zellvermittelte Immunität zuständig (u.a. Delayed-Type-Hypersensitivity, Bildung komplementbindender Antikörper gegen Bakterien) und produzieren v.a. die Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α . Sie sind die an der Transplantatabstoßung beteiligte Population, was sich durch den Nachweis der entsprechenden Zytokine im Transplantat zeigen läßt [Nickerson, P. et al. (1994a); Cobbold, S.P. et al. (1996)]. Die Th2-Zellen sind für die Vermittlung der humoralen Immunantwort verantwortlich (besonders neutralisierende IgG1- und antiparasitäre IgE-Antikörper) und produzieren IL-4, 5 und 6 sowie IL-10 [Nickerson, P. et al. (1994a); Cobbold, S.P. et al. (1996)]. Sie wirken im Rahmen der Transplantatabstoßung offenbar immunsuppressiv. Die jeweilige Population wird durch die eigenen Zytokine zu weiterer Proliferation stimuliert und durch die Zytokine der anderen Population in der Vermehrung gehemmt.

Mehrere Autoren haben nach Gabe von Anti-CD4-Antikörpern eine vermehrte Expression von Th2-Zytokinen bzw. deren mRNA und eine verminderte Expression von Th1-Zytokinen nachgewiesen [Nickerson, P. et al. (1994a); Cobbold, S.P. et al. (1996)]. Es herrscht Einigkeit darüber, daß selektive Th1-Aktivierung mit Abstoßung und selektive Th2-Aktivierung mit Toleranz assoziiert ist.

Allerdings bestehen Zweifel, ob das Dominieren der Th2-Zellen und somit die veränderte Zytokinexpression allein ursächlich für die Toleranzentwicklung sind oder lediglich eines der

Phänomene darstellen, die dabei auftreten [Nickerson, P. et al. (1994a); Cobbold, S.P. et al. (1996)]. Die Th2-Zytokine blockieren zwar v.a. in vitro viele Schritte der Transplantatabstossung und fördern viele der Toleranzentwicklung, jedoch können sie allein weder den einen Prozeß vollständig verhindern noch den anderen vollständig in Gang setzen [Nickerson, P. et al. (1994a); Cobbold, S.P. et al. (1996)]. Auch sind die einzelnen Zytokine bei genauerem Hinsehen nicht festzulegen auf eine bestimmte Wirkung. Sie sind in ihrer Wirkungsweise von der Umgebung abhängig und können so im Zusammenspiel mit verschiedenen Faktoren unterschiedliche und sogar gegensätzliche Wirkungen auf ihre Zielzellen haben [Nickerson, P. et al. (1994a)] so daß Zytokinkonstellation und –wirkung möglicherweise nur Folge anderer Prozesse sind.

Die Theorie der klonalen Anergie sieht die Ursache der Toleranzentwicklung in einer aberranten Signaltransduktion nach Antigenpräsentation auf Grund der Blockade des CD4-Moleküls, die zu Toleranz statt zur Aktivierung der entsprechenden T-Zelle führt.

Eine andere Erklärung für die Toleranzentwicklung bietet die Theorie der klonalen Anergie. Anergie ist ein Zustand, in dem die Zellen ihre spezifischen Antigene zwar erkennen können, jedoch darauf nicht mit Aktivierung und Proliferation antworten. Dieser Zustand wird vermutlich hervorgerufen durch Antigenpräsentation in einer für die Aktivierung der Zelle unzureichenden Umgebung. Die T-Zelle benötigt zur Aktivierung neben der Präsentation des Antigens zusammen mit dem MHC-Molekül kostimulierende Faktoren, die noch nicht alle im Detail bekannt sind. Es sind jedoch Interaktionen zwischen weiteren Zelloberflächenmolekülen beteiligt. Einige wichtige Zelloberflächenmoleküle bei der APC-T-Zellinteraktion sind ICAM 1/2 auf Seiten der APC und LFA1 auf Seiten der T-Zelle sowie CD48 und CD58, B7 und CD28/CTLA4 [Cobbold, S.P. et al. (1992); Charlton, B. et al. (1994); Nickerson, P. et al. (1994b)].

Das CD4-Molekül ist wesentlich an einer adäquaten T-Zellstimulation beteiligt. Bei der Behandlung mit blockierenden Anti-CD4-Antikörpern wird das CD4-Molekül für die Zelle unbrauchbar, es resultiert ein unvollständiges Signal, das statt zur Aktivierung zur Anergie führt, also dazu, daß die Zelle selbst dann nicht aktiviert wird, wenn beim nächsten Antigenkontakt das Antigen adäquat präsentiert wird [Cobbold, S.P. et al. (1992); Charlton, B. et al. (1994)]. Stattdessen wirken diese anergen T-Zellen auf nachrückende Zellen aus dem Thymus ihrer-

seits tolerogen, so daß zur Aufrechterhaltung der Toleranz keine weitere Gabe von Antikörpern nötig ist [Cobbold, S.P. et al. (1992); Cobbold, S.P. et al. (1996)].

Die mögliche Verknüpfung zwischen den beiden Theorien stellt die Beobachtung dar, daß anerge Zellen offenbar in der Lage sind, Th2-Zytokine zu exprimieren [Nickerson, P. et al. (1994a)].

Interessant ist in diesem Zusammenhang eine neuere Arbeit von Yamada und Mitarbeitern, die zeigt, daß Mäuse, in deren Immunsystem durch gezielte Immunisierung Th2-Zellen überwiegen, allogene Hornhauttransplantate im neovaskularisierten Transplantatbett langsamer abstoßen und daß dies sich durch Übertragung von Lymphozyten auch auf naive Empfänger übertragen ließ [Yamada, J. et al. (1999)].

Auch RIB 5/2 bewirkt eine Unterdrückung der Th-1-Zytokinexpression, so daß dieser Mechanismus sehr wahrscheinlich auch seiner Wirksamkeit bei der Toleranzentwicklung nach Hornhauttransplantation in dieser Arbeit zugrundeliegt.

Auch für den in dieser Arbeit verwendeten Anti-CD4-Antikörper RIB 5/2 wurde gezeigt, daß er die Bildung von Th1-Zytokinen im Transplantat zugunsten der Th2-Zytokine unterdrückt [Siegling, A. et al. (1994); Binder, J. et al. (1996)]. Es konnte gezeigt werden, daß nach Behandlung mit RIB 5/2 die Transkription der mRNA für die wichtigsten Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α sowie IL-2 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen deutlich reduziert war. Dagegen wurde die Expression der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 voll aufrechterhalten oder nur vorübergehend reduziert.

Dieser Nachweis wurde an den Modellen der Abstoßung nach Nierentransplantation [Siegling, A. et al. (1994)] und der akzelerierten Abstoßung nach Herztransplantation an der Ratte [Binder, J. et al. (1996)] geführt. Dies sind vaskularisierte Organe, deren immunologische Voraussetzungen von denen der Hornhaut des Auges differieren, wie oben ausführlich erläutert. Die Interaktion zwischen T-Zellen und APC und damit der Vorgang der T-Zellaktivierung an sich dürften aber nicht differieren, obwohl es sich im einen Fall um Spender- und im anderen Fall um Empfänger-APC handelt.

Somit ist anzunehmen, daß auch der Toleranzentwicklung nach Keratoplastik, die durch RIB 5/2 bewirkt wird, eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zu den Th2-Zellen und ihren Zytokinen zugrundeliegt.

Die die Gewebszerstörung vermittelnde Effektorzelle der Abstoßung ist noch nicht identifiziert. Aus dem Überwiegen einer Zellpopulation im Transplantat hat man versucht, diese zu ermitteln.

Obwohl eine zentrale Rolle der T-Zellen bei der Vermittlung der Abstoßungsreaktion mittlerweile wohl nicht mehr umstritten ist, bleibt die Frage nach der eigentlichen Effektorzelle der Abstoßung im Sinne der gewebszerstörenden Zellpopulation innerhalb der gesamten Transplantationsmedizin noch unbeantwortet [Orosz, C.G. u. VanBuskirk, A.M. (1998)].

In der Literatur finden sich unterschiedliche Ansichten dazu, welche Zellen im Hornhauttransplantat während der Abstoßung vorherrschen. Z.T. versucht man, davon abzuleiten, welche Zellen die zentrale Rolle für die Abstoßung spielen.

Pepose und Mitarbeiter untersuchten menschliche Hornhäute auf die infiltrierenden Zellen, allerdings erst, nachdem die Abstoßung mindestens zwei Monate zurücklag [Pepose, J.S. et al. (1985)], was nur eine begrenzte Aussage über die Verhältnisse zum Zeitpunkt der Abstoßung zuläßt. Es fanden sich in der Lymphozytenpopulation überwiegend T-Helferzellen, jedoch variierte der Anteil von Lymphozyten und Makrophagen zueinander stark zwischen den einzelnen Transplantaten.

Holland und Mitarbeiter stellen am Rattenmodell in den ersten beiden Wochen post op ein Dominieren von Makrophagen über $CD4^+$ Zellen bei kaum $CD8^+$ Zellen im Transplantat fest. In vierten Woche post op dominieren dann die $CD8^+$ Zellen, nachdem insgesamt der Lymphozytenanteil stark zugenommen hat [Holland, E.J. et al. (1994)]. Zu dem Ergebnis, daß nach anfänglichem Überwiegen der $CD4^+$ Zellen schließlich die $CD8^+$ Zellen dominieren, kommen auch Otsuka und Mitarbeiter [Otsuka, H. et al. (1990)].

Larkin und Mitarbeiter stellen dagegen ebenfalls an der Ratte fest, daß sowohl im infiltrierten Hornhautstroma als auch im Kammerwasser schließlich die $CD4^+$ Zellen vorherrschen [Larkin, D.F.P. et al. (1997)].

Auch in vorhergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde eine Dominanz von $CD4^+$ Zellen festgestellt, die sich in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigen ließ [Coupland, S.E. et al. (1995)].

In dieser Arbeit wird durch Störung der $CD4^+$ Zellen die Abstoßungsreaktion früh gestört. Dadurch läßt sich die Abstoßung z.T. gänzlich verhindern, was die zentrale Rolle der $CD4^+$ Zellen zeigt, obwohl sie nicht die Gewebszerstörung vermitteln.

Möglicherweise ist aber eine Annäherung an das Problem über die rein zahlenmäßige Dominanz einer Zellpopulation im Transplantat nicht ausreichend, um eine Aussage über die sozusagen „funktionelle“ Dominanz zu treffen. Es ist wenig wahrscheinlich, daß im Transplantat gar nicht vorhandene Zellen bei seiner Zerstörung eine große Rolle spielen, aber umgekehrt muß die zahlenmäßig überwiegende Population nicht zwangsläufig die entscheidende sein.

Der Antwort auf die Frage nach der Effektorzelle der Abstoßung kann sich diese Arbeit insofern nur begrenzt nähern, als die Anti-CD4-Antikörper die Signalerkennung der T-Helferzellen stören. Damit wird die Rekrutierung der Entzündungszellen und so besonders der Beginn der Abstoßungsreaktion torpediert und nicht die eigentliche Gewebeerstörung, die im nächsten Schritt erfolgen würde.

Aber es läßt sich mit dieser Arbeit immunhistologisch belegen, daß diese Störung des Beginns zu einer zahlenmäßigen Abnahme aller untersuchten Zellpopulationen im Transplantat führt und eine Abstoßung dadurch gänzlich verhindert werden kann. Dies spricht für eine zentrale Rolle der T-Helferzellen bei der Abstoßungsreaktion in der Hornhaut, wenn sie auch vermutlich nicht die eigentlich ausführenden Zellen hinsichtlich der Gewebeerstörung sind.

In anderen Transplantationsmodellen, besonders bei der Hauttransplantation, die ja immunologisch besonders „anspruchsvoll“ ist, kommen einige Autoren zu dem Ergebnis, daß Anti-CD4-Antikörper allein nicht ausreichen, um in allen Fällen Toleranz zu induzieren, und daß die Kombination mit Anti-CD8-Antikörpern noch wirkungsvoller sei [Cobbald, S.P. et al. (1992); Cobbald, S.P. et al. (1996)], wenn auch Anti-CD8-Antikörper allein am Auge wenig bewirken (s.u.). Das könnte bedeuten, daß auch ohne die CD4⁺ Zellen in einigen Fällen eine Abstoßung induziert werden kann. Dies wäre eine weitere Möglichkeit zu erklären, daß nicht alle Tiere unter dieser Therapie eine Toleranzentwicklung durchliefen. Aber der große Anteil der Tiere, bei denen dies der Fall war, spricht doch für eine Schlüsselrolle der T-Helferzellen in diesem Transplantationsmodell.

Mehrere Autoren konnten die Wirksamkeit der Anti-CD4-Antikörper und damit die Bedeutung der CD4⁺ Zellen, auch im Gegensatz zu den CD8⁺ Zellen, zeigen.

Zu Ergebnissen, die diese zentrale Stellung der CD4⁺ Zellen in der Abstoßungsreaktion in der Hornhaut untermauern, kommen mehrere Autoren.

Untersuchungen, die die Wirksamkeit depletierender Anti-CD4- und Anti-CD8-Antikörper vergleichen, zeigen keinerlei Verzögerung der Abstoßung durch Anti-CD8-Antikörper, wäh-

rend es durch die Anti-CD4-Antikörper zu einer signifikanten Verzögerung und in einem unterschiedlich hohen Prozentsatz zu Toleranzentwicklung kommt [He, Y.G. et al. (1991); Ayliffe, W. et al. (1992)].

Eine Untersuchung von Joo und Mitarbeitern zeigt, daß nur nach durchgemachter Transplantatabstoßung eine durch CD4⁺ Zellen vermittelte DTH-Reaktion gegen das Fremdantigen nachzuweisen ist. Die durch CD8⁺ Zellen vermittelte CTL-Reaktion zeigt sich dagegen auch bei Tieren, die ihr Transplantat nicht abstoßen. Dies kann als indirekter Hinweis auf die wichtige Rolle der CD4⁺ Zellen bei der Allograftreaktion gewertet werden [Joo, C.-K. et al. (1995)].

Eine weitere Untersuchung beschreibt die Wirksamkeit liposomal verkapselter topisch applizierter Anti-CD4-Antikörper nach Keratoplastik an der Ratte, nach deren Applikation es ebenfalls in einem hohen Prozentsatz zur Toleranzentwicklung kam [Pleyer, U. et al. (1996)]. In die Reihe dieser Arbeiten, die den CD4⁺ T-Helferzellen eine entscheidende Rolle in der Allograftreaktion am Auge zusprechen, reiht sich die vorliegende ein.

Anti-CD4-Antikörper haben sich in anderen Gebieten der Medizin bereits als für den Menschen gut verträgliche Therapie gezeigt, so daß sie den Anforderungen an eine Therapieform nach Keratoplastik auch in Hinsicht auf das Fehlen gravierender Nebenwirkungen gerecht werden können.

Es gibt sowohl bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen als auch auf dem Gebiet der Transplantation parenchymatöser Organe bereits Arbeiten, die zeigen, daß monoklonale Anti-CD4-Antikörper am Menschen mit Erfolg und nebenwirkungsarm eingesetzt werden können [Cobbold, S.P. et al. (1992); Delmonico, F.L. und Cosimi, A.B. (1996)]. Nach Keratoplastik sind beim Menschen in einzelnen Fällen monoklonale Antikörper gegen CD3, CD6 und CD52 mit Erfolg eingesetzt worden [Ippoliti, G. und Fronterre, A. (1989); Newman, D.K. et al. (1995)].

Ein Vorteil der Anti-CD4-Antikörper gegenüber anderen immunsuppressiv bzw. tolerogen wirkenden monoklonalen Antikörpern ist, daß sie zumindest im Tierexperiment zusätzlich eine Toleranzentwicklung gegenüber sich selbst bewirken können, d.h. es werden keine Anti-Immunglobulin-Antikörper gebildet, die zu allergischen Reaktionen und Unwirksamkeit der Therapie führen [Cobbold, S.P. et al. (1992); Lehmann, M. et al. (1992)].

Auf Grund all dieser Beobachtungen stellen die nicht depletierende Anti-CD4-Antikörper eine vielversprechende Therapiealternative in der Prävention und Therapie der Allograftreaktion auch nach Hochrisikokeratoplastik dar.