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

Referent: Prof. Dr. F. Hoffmann

Koreferent: Prof. Dr. M. Wiederholt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 7. September 2001

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. OPERATIONSMETHODE 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 + Cycosporin A 49

DISKUSSION 54

ZUSAMMENFASSUNG 71

LITERATURVERZEICHNIS 72

ANHANG 1 **82**

ANHANG 2 **83**

ANHANG 3 **84**

LEBENSLAUF **85**

EINLEITUNG

1. Hornhauttransplantation

1.1 Kurzer geschichtlicher Überblick

Bereits Ende des 18. Jahrhunderts dachte Pellier de Quengsy darüber nach, wie man Menschen mit leukomatöser Hornhaut ihr Augenlicht zurückgeben könnte. Er dachte daran, die ausgeschnittene Hornhaut durch durchsichtiges Material wie Glas zu ersetzen.

Wenig später äußerte E. Darwin bereits den Gedanken, man könne die kranke Hornhaut mit einem Gerät wie einem kleinen Trepan ausschneiden, in der Hoffnung, der Defekt werde mit einer transparenten Narbe heilen.

Die erste erfolgreiche Keratoplastik am Menschen wurde 1905 von Zirm [Zirm, E.K. (1906)] durchgeführt. Das Transplantat blieb klar bis zum Tode des Patienten drei Jahre nach der Operation.

Zirm forderte die Einhaltung bestimmter Regeln bei der Keratoplastik. So z.B. die ausschließliche Verwendung homologen Materials von jungen und gesunden Spendern, die Ausschneidung des Transplantates mit Hilfe des v. Hippel entwickelten Trepans, die präoperative Verwendung von Eserin, eine angemessene Anästhesie, die Einhaltung strenger Asepsis und die Transplantatsicherung.

Einige Jahre später begann Leoz-Ortin mit systematischen Tierexperimenten zur Keratoplastik und faßte seine Ergebnisse wie folgt zusammen: Autologe Transplantate erzielen die besten Ergebnisse, homologe Transplantate erzielen gute Ergebnisse, heterologe Transplantate werden immer trüb. Damit machte er auf Grund systematischer Untersuchungen Aussagen über Rolle der Gewebeverträglichkeit bei der Hornhauttransplantation.

Mit weiteren Neuerungen wie der Einführung des Operationsmikroskops und der Entwicklung feinerer Operationsinstrumente und feineren Nahtmaterials sowie der Entdeckung der Antibiotika konnte die Keratoplastik bald routinemäßig mit gutem Erfolg durchgeführt werden. Die Hornhauttransplantation ist heute die am häufigsten durchgeführte Transplantation weltweit [Bouchard, C.S. und Canavan, H.D. (1994); Council of Scientific Affairs (1988)].

Aber die Abstoßung auf Grund von Gewebeunverträglichkeit, die als Ursache für das Trübwerden von Transplantaten schon lange bekannt ist, bleibt als das Hauptproblem der Horn-

hauttransplantation bestehen, auch wenn seit den fünfziger Jahren mit den Steroiden eine in vielen Fällen effektive Immunsuppression zur Verfügung steht.
Eine Behandlung, die beim Empfänger zuverlässig und ohne gravierende Nebenwirkungen eine Toleranzentwicklung gegenüber dem Transplantat bewirkt, steht noch aus.

1.2 Hornhauttransplantation heute

1.2.1 Indikationen zur Keratoplastik

Die häufigsten Indikationen zur Keratoplastik im Einzugsbereich von Eurotransplant nach einer Umfrage in 57 Zentren 1991 waren folgende [Beekhuis, W.H. (1995)]:

Pseudophakische bullöse Keratopathie	28,0 %
Keratokonus	25,7 %
Herpes simplex-Keratitis	16,0 %
Endotheliale Dystrophie Fuchs	6.0 %
Ulcus corneae	4.5 %
Narbe nach Trauma	4.5 %
andere	15.2 %

1.2.2 Risikofaktoren - Hochrisikokeratoplastik

Heute liegt die 1-Jahres-Transplantatüberlebensrate nach Keratoplastik bei etwa 90% [Council of Scientific Affairs (1988); Lindstrom, R.L. (1986)], und die meisten Transplantate bleiben klar, ohne daß es einer langfristigen immunsuppressiven Therapie bedarf. Eine solche „Quote“ wird in keinem anderen Gebiet der Transplantationsmedizin erreicht. Die Hornhaut ist also, verglichen mit anderen, ein sehr dankbares Transplantationsorgan.
Risikofaktoren für die Transplantatabstoßung sind vor allem Entzündung und Vaskularisation – 10% aller Keratoplastiken sind Hochrisikokeratoplastiken mit einem Abstoßungsrisiko bis zu 60%.
Trotz dieser günstigen Verhältnisse am Auge ist die Abstoßung auf Grund einer Immunreaktion heute die häufigste Ursache für das Scheitern einer Hornhauttransplantation.
Etwa 30% der Patienten durchlaufen nach penetrierender Keratoplastik eine Abstoßungsepisode und etwa 10% der Keratoplastiken scheitern auf Grund von Immunreaktionen [Council of Scientific Affairs (1988)].

Bei den etwa 10% der durchgeführten Keratoplastiken, die als „high risk keratoplasty“ gelten, liegt das Risiko für eine Immunreaktion bei bis zu 60% [Council of Scientific Affairs (1988), Bouchard, C.S. und Canavan, H.D. (1994)]. Hierzu zählen u.a. Keratoplastiken bei vaskularisierter Hornhaut, bei bereits fehlgeschlagene Keratoplastiken in der Vorgeschichte sowie bei Entzündungen des vorderen Augenabschnittes. Weitere relevante Faktoren für das erhöhte Risiko einer Abstoßungsreaktion sind der Bedarf an besonders großen oder exzentrischen Transplantaten, das Alter des Empfängers (häufigere Immunreaktionen unter 60 Jahren) und das zugefügte Operationstrauma [Larkin, D.F.P. (1994); Pleyer, U. (1997)].

2. Die Pathogenese der Abstoßungsreaktion

2.1 Grundlegendes

Medawar zeigte 1944, daß die Transplantatabstoßung die wesentlichen Charakteristika einer Immunreaktion aufweist [Medawar, P.B. (1944)]. Er wies nach, daß der Organismus ein Gedächtnis für das transplantierte Gewebe entwickelt und daß die ausgelöste Reaktion spezifisch für das Spendergewebe ist, d.h. beim zweiten Kontakt mit demselben Gewebe läuft eine wesentlich schnellere und heftigere Reaktion ab als beim ersten, bei Kontakt mit Gewebe von andere Spendern läuft die Reaktion dagegen genauso wie beim ersten Kontakt ab.
Das Immunsystem dient der Abwehr von in den Körper eingedrungenen „Fremdkörpern“ jeder Art, insbesondere von Infektionserregern. Dabei läuft auf molekularer Ebene die Erkennung von Fremdantigenen im Gegensatz zu körpereigenen Strukturen ab. Das Selbst ist genetisch genau definiert. Innerhalb einer Spezies gleicht hinsichtlich der für diese Erkennung relevanten Strukturen kein Individuum dem anderen - ausgenommen eineiige Zwillinge mit identischem genetischem Material.
Die eindeutige Self-Nonself-Diskriminierung wird durch die darauffolgende Zerstörung des als fremd erkannten Gewebes auch für die Transplantationsmedizin relevant, die ja den Ersatz defekter körpereigener Organe durch Fremdgewebe betreibt.

2.1.1 Der Major Histocompatibility Complex (MHC)

Wesentlich für die Self-Nonself-Diskriminierung ist der Major Histocompatibility Complex (MHC). Die meisten Genorte dieses MHC auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 weisen innerhalb einer Spezies einen hohen Grad an Polymorphie auf. Durch eine jeweils einmalige

Kombination aus dem Pool der vielen verschiedenen Allele wird die Einzigartigkeit jedes Individuums genetisch definiert.

Das Selbst wird durch MHC-Klasse I- und II-Moleküle definiert.

Es gibt drei Gruppen von MHC-Genen, von denen die Klassen I und II für die Definition des Selbst von Bedeutung sind. Die Gene dieser Gruppen kodieren Zelloberflächenproteine, die durch ihre jeweils besondere Struktur quasi das Selbst definieren. Sie besitzen eine Vertiefung besonderer Konfiguration, in der Peptide gebunden werden. MHC-Klasse I-Moleküle binden und präsentieren körpereigene Peptide, MHC-Klasse II-Moleküle dagegen körperfremde, die nach Aufnahme von Fremdantigenen in die Zelle in prozessierter Form zusammen mit den MHC-Molekülen wieder an die Zelloberfläche gelangen.

MHC-Klasse I-Moleküle finden sich auf fast allen kernhaltigen Körperzellen. MHC-Klasse II-Moleküle dagegen werden konstitutiv nur von B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen (Antigen-präsentierende Zellen, s.u.) exprimiert. Nach Aktivierung durch bestimmte Zytokine (Interferon γ, IFNγ) können allerdings auch andere Zellen wie Endothelzellen, epitheliale Zellen oder Fibroblasten MHC-Klasse II-Moleküle exprimieren.

T-Lymphozyten erkennen Antigene nur in Verbindung mit körpereigenem MHC.

Erkannt werden die MHC-Moleküle und die präsentierten Peptide von T-Lymphozyten. Die Antigenerkennung der T-Lymphozyten ist MHC-restringiert, d.h. sie erkennen ein Antigen nur, wenn es ihnen zusammen mit einem körpereigenen MHC-Molekül präsentiert wird.

Dabei erkennen CD8-positive ($CD8^+$), also zytotoxische oder Suppressor-T-Zellen, MHCMoleküle der Klasse I.

$CD4^+$ T-Helferzellen, die eine zentrale Rolle bei der Immunantwort spielen, indem sie die meisten beteiligten Zellen aktivieren, erkennen MHC-Klasse II-Moleküle.

Im Transplantat erkennt der Oganismus wohl auch fremdes MHC.

Im Falle der MHC-Moleküle eines Transplantates ist noch nicht geklärt, wieso sie den eigentlich Selbst-MHC-restringierten T-Zellen in einer Weise Antigene präsentieren können, die zu einer äußerst heftigen Immunantwort führt.

Es wäre einerseits denkbar, daß eine Immunantwort dadurch ausgelöst wird, daß die MCH-Moleküle an sich fremde Moleküle sind, die dann eigentlich ihrerseits präsentiert werden müßten. Die andere Möglichkeit ist, daß die fremden MHC-Moleküle auf Grund der anderen Struktur ihrer Bindungsstelle andere Peptide präsentieren als die, die körpereigene MHC-Moleküle auf Grund ihrer Struktur präsentieren, so daß den T-Zellen des Empfängers fremde

Peptide durch MHC-Moleküle in besonders effektiver Weise präsentiert werden [Hornick, P. und Lechler, R. (1997)].

2.1.2 Antigen-präsentierende Zellen (APC)

Wie bereits erwähnt, sind MHC-Klasse II-Moleküle nur auf B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen konstitutiv vorhanden. Diese Zellen sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) und können durch die Antigenpräsentation die $CD4^+$ T-Helferzellen in besonders effektiver Weise zur Proliferation und zur Ausschüttung von Zytokinen anregen, die nötig sind, um die weitere Immunantwort in Gang zu setzen.

Die dendritischen Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation und so auch bei der Transplantatabstoßung.

Unter diesen drei Zellgruppen kommt den dendritischen Zellen (DC) eine besondere Bedeutung zu. Sie stammen aus dem Knochenmark und sind offenbar verschieden von den Makrophagen. Bis auf das Gehirn kommen sie in jedem Gewebe vor, in der Haut und der Hornhaut des Auges als sogenannte Langerhanszellen, wenn auch am Auge nur in geringer Dichte.

Gegenüber Makrophagen und B-Lymphozyten sind die DC mit einigen besonderen „Werkzeugen“ ausgestattet, die sie zu besonders effektiven APC machen. Die gewebsständigen, unreifen DC können auf Grund ihrer Möglichkeiten zur Makropinozytose und zur rezeptorvermittelten Antigen-Aufnahme bereits Antigene, die in nano- und picomolaren Konzerntrationen auftreten, effektiv präsentieren, während für Makrophagen und B-Zellen mikromolare Konzentratioen erforderlich sind. Nach der Antigenaufnahme wandern die Zellen über die Lymphbahnen in die lymphatischen Organe. Das aufgenommene Antigen wird zur Präsentation mit MHC-II-Molekülen zusammengeführt, die von DC in zehn- bis hundertfach höherer Konzentration als von anderern APC exprimiert werden. Schließlich exprimieren DC auch in besonders hohem Maße kostimulierende Moleküle wie z.B. LFA-3, ICAM-1 und B7, die zur T-Zellaktivierung offenbar unabdingbar sind [Banchereau, J. und Steinman, R.M. (1998)].

Auf Grund dieser besonders effektiven Antigenpräsentation können dendritische Zellen sowohl im Gewebe bereits aktivierten als auch in den T-Zonen der lymphatischen Organe naiven T-Zellen oder ruhenden Memory-Zellen Antigene präsentieren und damit eine primäre Immunantwort gegen bisher nicht präsentierte Antigene anstoßen, während Makrophagen und

B-Lymphozyten Antigene wohl vor allem bereits aktivierten T-Lymphozyten präsentieren [Banchereau, J. und Steinman, R.M. (1998)].
Wegen ihres fast ubiquitären Vorkommens haben die dendritischen Zellen in der Transplantationsmedizin große Bedeutung erlangt.
Man glaubt heute, daß die zur Transplantatabstoßung führende Präsentation von Spenderantigenen auf zwei verschiedenen Wegen geschehen kann: Zum einen durch sogenannte direkte Antigenpräsentation durch die spendereigenen, mittransplantierten APC, sog. „passenger leukocytes“, zum anderen durch sogenannte indirekte Antigenpräsentation durch die in das Transplantat einwandernden APC des Empfängers [Hornick, P. und Lechler, R. (1997); Katami, M. (1995)].

2.1.3 Minore Histokompatibilitätsantigene

Neben den MHC-Antigenen existieren sogenannte minore Histokompatibilitätsantigene (minore H-Antigene), die über das Genom verteilt und ebenfalls polymorph sind. Sie müssen von MHC-Molekülen präsentiert werden und lösen i.a. schwächere Transplantationsreaktionen aus, spielen aber eine wichtige Rolle z.B. bei der Entstehung der Graft-versus-host-Reaktion.
Die minoren H-Antigene sind auf Grund ihrer offensichtlich geringeren Bedeutung für die Transplantation und ihrer schlechteren Zugänglichkeit längst nicht so gut charakterisiert wie die Antigene des MHC-Komplexes.
Bei der Hornhauttransplantation spielen Minore H-Antigene aber vermutlich eine größere Rolle als bei der Transplantation anderer Organe (s.u.).

2.1.4 Effektormechanismen der Abstoßungsreaktion

Die genaue Vermittlung der Gewebszerstörung bei der Abstoßung ist bis heute unklar.
Durch welche Effektormechanismen die Abstoßungsreaktion genau vermittelt wird, ist bis heute unklar [Orosz, C.G. u. VanBuskirk, A.M. (1998)]. Man weiß, daß ein Zusammenwirken von APC und $CD4^+$ T-Helferzellen notwendig ist und daß letztere verschiedene Zytokine ausschütten müssen, insbesondere Interleukin 2 (IL-2) und IFNγ. Dadurch wird zum einen die Differenzierung von $CD8^+$ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen und zum andern die Aktivierung von Makrophagen und damit die Delayed Type Hypersensitivity-Reaktion in Gang gesetzt. Von beiden Zellpopulationen nimmt man auf Grund ihres Vorkommens im Transplantat bei der Abstoßungsreaktion an, daß sie Effektoren der Abstoßungsreaktion darstellen, weiß

jedoch nicht, welchen Stellenwert sie einnehmen. Unter anderem neuere Studien an Knock-out-Mäusen weisen allerdings darauf hin, daß $CD8^+$ Zellen im Gegensatz zu $CD4^+$ Zellen bei der Abstoßung entbehrlich sind [Hall, B.M. (1991); Krieger, N.R. et al. (1996)].
Unspezifische Mechanismen der Transplantatschädigung sind wahrscheinlich Apoptosevorgänge [Kabelitz, D. (1998)] und die nicht antigenspezifische Entzündung, die durch die Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen und die ausgeschütteten Zytokine in Gang gesetzt wird [Orosz, C.G. u. VanBuskirk, A.M. (1998)].
Bei der Transplantatabstoßung parenchymatöser Organe spielt auch die humorale Immunantwort eine u.U. sehr wichtige Rolle. Insbesondere präformierte lymphozytotoxische oder gegen ABO-Antigene gerichtete Antikörper können zu einer hyperakuten, akuten vaskulären, oder auch chronischen Transplantatabstoßung führen. Aber auch Antikörper, die erst nach Transplantation gebildet werden, können zumindest zur Abstoßung beitragen [Platt, J.L. (1995)].

2.2 Das okuläre Immunsystem - Besonderheiten der Immunologie des Auges

Das Auge gehört neben einigen anderen Geweben zu den Orten des Körpers mit einem sogenannten Immunprivileg, d.h. hier überlebt histoinkompatibles Gewebe länger als in Geweben ohne diese immunologische Besonderheit [Grisanti, S. (1998)]. Andererseits sind im Auge aber viele Komponenten des Immunsystems vertreten, und es gibt Konstellationen, in denen das Immunprivileg nicht aufrechterhalten wird.

2.2.1 Immunkompetente Zellen in der Hornhaut

Vor allem in der peripheren Hornhaut finden sich Langerhanszellen, Makrophagen sowie B- und T-Lymphozyten.

Bei Mensch, Ratte und anderen Säugetieren finden sich in der Hornhaut ebenso wie in der Konjunktiva und der Haut Langerhanszellen, eine Untergruppe der dendritischen Zellen. Sie exprimieren MHC-Klasse II-Antigen und gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APC, s.o., 2.1).
Langerhanszellen finden sich in großer Anzahl in der Konjunktiva, deutlich weniger dicht am Limbus und nur vereinzelt in den zentralen Hornhautanteilen. Sie sind in den unteren Schichten des Epithels und den oberen Stromaanteilen lokalisiert [Gillette, T.E. et al. (1982); Katami, M. (1995); Klareskog, L. et al. (1979); Rodrigues, M.M. et al. (1981)].

In der peripheren Hornhaut finden sich auch Lymphozyten und Makrophagen.

B-Lymphozyten finden sich vor allem am Limbus in mäßiger Anzahl um die kleinen Gefäße und im Epithel, sowie vereinzelt im Epithel und oberen Stroma der übrigen Hornhaut [Vantrappen, L. et al. (1985)], ihre Anwesenheit ist jedoch nicht unumstritten [Scheiffarth, O.F. et al. (1986)]. $CD4^+$ T-Helferzellen sind am Limbus um die Gefäße konzentriert und finden sich in der Hornhaut im Epithel und den oberen Stromaanteilen, ebenso $CD8^+$ T-Suppressorzellen [Scheiffarth, O.F. et al. (1986); Vantrappen, L. et al. (1985)]. Makrophagen finden sich vor allem im Limbusstroma [Vantrappen, L. et al. (1985)].

2.2.2 Histokompatibilitätsantigene in der Hornhaut

Die für die Erkennung fremden Gewebes wichtigen Antigene des MHC finden auch in den okulären Geweben einschließlich der Hornhaut, wobei sich die menschliche und die in dieser Arbeit untersuchte Rattenhornhaut hinsichtlich der Orte der Expression nicht wesentlich unterscheiden [Treseler, P.A. und Sanfilippo, F. (1986)].

MHC-Klasse I-Antigene sind in der Hornhaut auf Epithelzellen und Keratozyten nachweisbar, MHC-Klasse II-Antigene fast ausschließlich auf Langerhanszellen

Die MHC-Klasse I-Antigene finden sich auf den Zellen des Hornhautepithels und auf den Keratozyten des Stromas, auf den Zellen des Hornhautendothels wird nach Ansicht der meisten Autoren kein MHC-Klasse I exprimiert [Vantrappen, L. et al. (1985); Williams, K.A. et al. (1985)].

MHC-Klasse II-Antigene finden sich in der Hornhaut so gut wie ausschließlich auf den Langerhanszellen (APC) und auf einigen Makrophagen im Stroma im Bereich des Limbus [Vantrappen, L. et al. (1985); Williams, K.A. et al. (1985)]. Der zentrale Anteil der Hornhaut ist fast frei von MHC-II-Antigenen.

Allerdings kann die Expression von MHC-Klasse II-Antigenen durch Zytokine, insbesondere Interferon γ (IFNγ), induziert werden, so daß sich in der Hornhaut bei Entzündungen, z.B. bei der Allograftreaktion, z.T. auch auf dem Endothel und den Stromakeratozyten MHC-Klasse II-Antigene nachweisen lassen, durch deren Expression die Erkennung des Fremdgewebes und dessen Zerstörung beschleunigt wird [Coupland, S.E. et al. (1994); Donnelly, J.J. et al. (1985); Dreizen N.G. et al. (1988); Pepose, J.S. et al. (1985)].

Offenbar ist die Rolle der MHC-Antigene bei der Immunreaktion am Auge begrenzt, während minore Histokompatibilitätsantigene hier eine größere Rolle zu spielen scheinen als bei der Transplantation parenchymatöser Organe.

Die Rolle der MHC-Antigene bei der Allograftreaktion am Auge ist allerdings nicht so eindeutig wie bei der Transplatation parenchymatöser Organe.

Es konnte für das bei der Transplantation parenchymatöser Organe anerkannt wichtige HLA-Matching bisher nicht eindeutig gezeigt werden, daß es die Erfolgsrate bei der Keratoplastik verbessert. Wenn auch kleinere Studien einen positiven Effekt des HLA-Matchings nahelegen, konnte doch eine multizentrische Studie aus den USA dies nicht bestätigen [Council of Scientific Affairs (1988); Hill, J.C. (1995); Hoffmann, F. und Pahlitzsch, T. (1989); Stark, W. et al. (1992)].

Nach Keratoplastik finden dagegen bei Inkompatibilität im Bereich der minoren Histokompatibilitätsantigene (H-Antigene) offenbar heftigere Abstoßungsreaktionen statt als bei MHC-Inkompatibilität [Sano, Y. et al. (1997); Sonoda, Y. et al. (1995)].

Viele dieser minoren H-Antigene sowie ihrer Genorte sind noch nicht identifiziert. Wahrscheinlich handelt es sich zu einem großen Teil um Gene, die für Proteine ohne primär immunologische Funktion, z.B. Regulatorproteine der DNA-Transkription, kodieren. Eine Hypothese geht davon aus, das die Polymorphie dieser Gene und damit die Kodierung für Histoinkompatibilität sekundär auf Grund langsamer Divergenz der DNA-Sequenz in eigentlich konservierten Bereichen des Genoms entsteht.

Auch Teile des mitochondrialen Genoms kodieren für minore H-Antigene. Ein bekannter Vertreter der minoren H-Antigene ist das H-Y-Antigen des männlichen Geschlechts [Simpson, E. et al. (1998)].

Für die begrenzte Rolle der MHC-Antigene und die wichtigere Rolle der minoren H-Antigene finden sich mögliche Erklärungen in der besonderen Anatomie und Immunologie des Auges. Wie bereits erwähnt, finden sich im zentralen Anteil der gesunden Hornhaut fast keine APC und so auch kaum MHC-II-Antigene. MHC-I-Antigene werden weniger als in anderen Geweben exprimiert. Die bei der Transplantation parenchymatöser Organe stattfindende direkte Antigenpräsentation durch in den Empfängerorganismus einwanderende Spender-APC findet so nach Keratoplastik praktisch nicht statt. Bei der Antigenpräsentation der Spenderantigene durch in das Transplantat eingewanderte Empfänger-APC überwiegen dann auf Grund der

Armut des Transplantats an MHC-Antigenen die minoren H-Antigene [Katami, M. (1995); Sano, Y. et al. (1997); Sonoda, Y. et al. (1995)].

2.2.3 Das Immunprivileg des Auges - ACAID

Wie bereits erwähnt, sind Hornhauttransplantationen beim Menschen ohne immunsuppressive Therapie zu einem sehr hohen Prozentsatz erfolgreich (etwa 90% 1-Jahresüberleben im Gegensatz zu z.B. Nierentransplantationen mit 60%).

Fremdgewebe überlebt im Auge länger als an anderen Stellen im Organismus

Bereits Medawar konnte zeigen, daß eingebrachtes Fremdgewebe in der Augenvorderkammer länger überlebt als an den meisten anderen Stellen des Organismus. [Medawar, P.B. (1948)]. Niederkorn und Streilein zeigten später, daß durch das Einbringen von Fremdantigenen in den Organismus über die Augenvorderkammer eine Toleranz des Organismus gegenüber diesen Antigenen erreicht werden kann [Streilein, J.W. et al. (1980)]. Dieses offensichtliche Immunprivileg besteht am Auge in der Vorderkammer, dem Hornhautstroma, dem Glaskörper- und dem Subretinalraum. Außerhalb des Auges existiert ein Immunprivileg auch in anderen Organen wie im Gehirn und im Hoden [Grisanti, S. (1998)].

Das Immunprivileg des Auges beruht auf einer lokalen immunologischen Aberration auf Grund anatomischer und physiologischer Besonderheiten.

Das Immunprivileg basiert einerseits auf anatomischen Besonderheiten des Auges.

Es existieren eine Blut-Kammerwasser- und eine Blut-Retina-Schranke, die das Auge von zellulären und humoralen Bestandteilen des Immunsystems abschirmen.

Im weiteren ist die zentrale Hornhaut fast gänzlich frei von Langerhanszellen und auch anderen Leukozyten, so daß hier so gut wie keine Antigenpräsentation stattfindet, die zur Aktivierung des efferenten Immunsystems führen würde.

Andererseits basiert das Immunprivileg auf einer abweichenden Immunantwort des Organismus auf Antigene, mit denen er über die Augenvorderkammer in Kontakt kommt, auf der sog. Anterior Chamber Associated Immune Deviation (ACAID) [Niederkorn, J. et al. (1981)]. Bei dieser abweichenden Reaktion fehlt die Entwicklung einer DTH-Reaktion bei normaler Bildung von Präkursoren spezifischer zytotoxischer T-Zellen, und es fehlt die Bildung komplementfixierender Antikörper bei erhöhten Titern nicht komplementfixierender Antikörper. Ausserdem exprimieren die an die Vorderkammer angrenzenden Zellen Apoptose-induzie-

rende Strukturen wie den Fas-Liganden, so daß inflammatorische Zellen beim Kontakt in Apoptose übergehen [Grisanti, S. (1998); Streilein, J.W. et al. (1997)].

ACAID verhindert okuläre Entzündungsreaktionen und schützt so die Sehkraft.

Diese besondere immunologische Reaktionslage verhindert in den sehr sensiblen Geweben des Auges gewebszerstörende Entzündungsreaktionen, die normalerweise bei Reaktionen des Immunsystems auf Fremdantigene ablaufen, im Auge aber mit einer erheblichen Einschränkung der Sehfähigkeit einhergehen würden [Grisanti, S. (1998); Streilein, J.W. et al. (1997)].

Allerdings ist das Immunprivileg nicht unüberwindbar, bei ausreichend starken Entzündungsreizen kommt es zum Zusammenbruch des Systems.

3. Makropathologie und Histologie der Transplantatabstoßung

Khodadoust und Silverstein haben gezeigt, daß jede der drei Zellschichten der Hornhaut - Epithel, Stroma oder Endothel - eine Abstoßung auslösen kann und daß dann eine für die jeweilige Schicht morphologisch charakteristische Abstoßungsreaktion abläuft [Khodadoust, A.A. und Silverstein, A.M. (1969)].

An der Hornhaut lassen sich eine endotheliale, stromale und epitheliale Immunreaktion unterscheiden.

Klinisch am häufigsten zu beobachten ist die endotheliale Abstoßung. Meist nimmt sie von einem vaskularisierten Hornhautbereich ihren Ausgang und wird von einer zellulären Vorderkammerreaktion begleitet. Sie geht mit einer endothelialen Khodadoustlinie und/oder mit diffusen Endothelpräzipitaten einher. Dies sind die makroskopischen Entsprechungen von Lymphozyten- und Makrophageninfiltraten am Endothel [Khodadoust, A.A. und Silverstein, A.M. (1969); Pleyer, U. (1997)]. Es kommt auf Grund der Zerstörung des Endothels zu einem Hornhautödem mit Eintrübung und Funktionsverlust des Transplantats.

Epitheliale und stromale Immunreaktion sind deutlich seltener. Die epitheliale Immunreaktion zeigt sich durch eine epitheliale Khodadoustlinie. Meist läuft die Reaktion ab, ohne das Transplantat als solches zu gefährden, und das zerstörte Spenderepithel wird rasch durch das des Empfängers ersetzt.

Die stromale Immunreaktion ist entweder durch subepitheliale Infiltrate oder durch eine durchgreifende Stromaeintrübung gekennzeichnet, die sich bandförmig über das Transplantat bewegt. Letztere mündet häufiger in eine endotheliale Immunreaktion mit den oben genannten Folgen [Khodadoust, A.A. und Silverstein, A.M. (1969); Pleyer, U. (1997)].

Histologisch geht eine unspezifische Entzündungsreaktion der eigentlichen Immunreaktion voraus und triggert diese möglicherweise.

Histologisch können bei der Abstoßung eines Hornhauttransplantats mehrere Phasen beobachtet werden. Zunächst findet sich 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)]. Nach etwa einer Woche nimmt bei den Augen, die eine Abstoßungsreaktion durchlaufen, die Vaskularisation der Hornhaut deutlich zu, und die Gefäße dringen ins Transplantat ein. Auch die Irisgefäße schwellen an, und es findet sich eine lymphozytische Infiltration des Irisstromas. Im Transplantat entwickelt sich ein deutliches Ödem des Stromas begleitet von einer starken Infiltration durch Lymphozyten, Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten. Das Spenderepithel und -endothel werden von Lymphozyten und Makrophagen infiltriert. Insbesondere das Endothel geht zugrunde und wird von fibroblastischen Zellen ersetzt, z.T. bilden sich retrocorneale Membranen [Callanan, D.G. et al. (1989); Gronemeyer, U. et al. (1978); Holland, E.J. et al. (1991)].

Mit Hilfe der Immunhistochemie läßt sich nachweisen, daß sich das zelluläre Infiltrat in der Hornhaut im Rahmen der Immunreaktion v.a. aus $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten, also T-Lymphozyten, sowie Makrophagen zusammensetzt, während B-Lymphozyten zahlenmäßig keine wesentliche Rolle spielen [Hikita, N. et al. (1997); Holland, E.J. et al. (1991); Pepose, J.S. et al. (1985b)].

Auf die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen verschiedener Autoren wird in der Diskussion im einzelnen eingegangen.

4. Prävention und Behandlung der Abstoßung in der Klinik

Steroide stellen nach wie vor das zentrale Behandlungsprinzip dar, sie werden ergänzt durch Cyclosporin A.

Die tragende Säule sowohl in der Prävention der Abstoßung als auch in der Behandlung akuter Abstoßungsepisoden sind bis heute die Kortikosteroide [Hill, J.C. (1995)]. Am Auge ist die starke antiphlogistische Wirkung der Steroide von großer Bedeutung. Sie verringern z.B. die Gefäßpermeabilität und -proliferation und hemmen die Migration von Entzündungszellen und die Zytokinproduktion [Pleyer, U. et al. (1998)]. Außerdem spielt möglicherweise die durch Steroide erzielte Verminderung der Langerhanszellen in der Hornhaut sowie deren re-

duzierte Fähigkeit zur Antigenpräsentation eine Rolle [Jager, M.J. et al. (1995)]. Allerdings haben Steroide neben systemischen Nebenwirkungen auch am Auge eine Reihe wichtiger unerwünschter Wirkungen wie Wundheilungsstörungen, erhöhte Infektionsgefahr, Erhöhung der Augendruckes und Kataraktbildung [Pleyer, U. et al. (1998)].

Steroide werden nach Keratoplastik routinemäßig topisch als Augentropfen zur Prävention der Abstoßung eingesetzt. Die meisten Patienten erhalten dies als einzige Form der Immunsuppression, z.T. ergänzt durch eine subkonjunktivale Steroidgabe am Ende der Operation. Zur Kupierung einer Abstoßungsreaktion werden mit recht gutem Erfolg systemische Steroide entweder oral über mehrere Tage oder hochdosiert intravenös als einmalige Pulstherapie gegeben [Hill, J.C. (1995)].

Bei den Hochrisikokeratoplastiken verhindert die topische Gabe von Steroiden auch in hohen Dosen jedoch eine Abstoßung nicht sicher, und auch die systemische Gabe von Steroiden scheint in diesen Fällen nicht wirksamer zu sein [Hill, J.C. (1995)]. Zudem ist die Gabe von Steroiden der Wundheilung und damit in einigen Fällen dem Erfolg der Transplantation nicht zuträglich.

Als Ergänzung zu den Steroiden steht Cyclosporin A entweder topisch oder systemisch gegeben zur Verfügung. Der Nutzen von topischem CyA ist noch nicht eindeutig erwiesen, allerdings ist auch die am besten geeignete Darreichungsform noch nicht ermittelt [Hill, J.C. (1995)]. Systemisch gegeben verhindert CyA die Abstoßung recht zuverlässig. Im Gegensatz zur Immunsuppression nach Transplantation vaskularisierter Organe, die lebenslang notwendig ist, scheint es möglich, die CyA-Gabe nach Hornhauttransplantation nach einiger Zeit zu beenden. Die optimale Dauer der Anwendung ist aber noch nicht bekannt [Hill, J.C. (1995)].

Eine systemische Immunsuppression z.B. durch CyA mit ihren potentiell tödlichen Nebenwirkungen ist allerdings zur Erhaltung eines nicht lebenswichtigen Organes nur schwer zu rechtfertigen [Coster, D.J. and Williams, K.A. (1992)].

(Zur Gewebstypisierung bei Keratoplastik s.o., 2.2.2.)

5. Tiermodelle – Kaninchen, Ratte, Maus

Für die Erforschung des Auges wurden seit Beginn systematischer Experimente Tiermodelle gesucht, die die Gegebenheiten am menschlichen Auge möglichst gut repräsentieren.

Seit den 40er Jahren wurde ein Kaninchenmodell der penetrierenden Keratoplastik intensiv genutzt [Maumenee, A.E. (1951); Khodadoust, A.A. (1968)]. Vorteile dieses Modells sind die

gute Handhabbarkeit der Tiere und vor allem die Ähnlichkeit von Kaninchen- und menschlichem Auge in Form und Größe. Von großem Nachteil sind die fast völlig fehlenden Inzuchtstämme bei Kaninchen ebenso wie die nur geringen Kenntnisse über den MHC-Komplex dieser Tiere. Der Grad der Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger ist nicht kontrollierbar. So können die Auswirkungen immunologischer Barrieren auf die Transplantation an diesen Tieren nur sehr unzulänglich beobachtet werden. Es gibt auch kaum monoklonale Antikörper gegen Zelloberflächenantigene der Tiere, was die Auswertungsmöglichkeiten der Untersuchungen weiter einschränkt. Trotzdem konnten an diesem Modell grundlegende Beobachtungen zur Allograftreaktion in der Hornhaut gemacht werden, wie z.B. über die Bedeutung der Avaskularität des Empfängerbettes für die Integrität des Transplantats.

Bei Mäusen oder Ratten gibt es derartige Probleme nicht. Viele Inzuchtstämme sind vorhanden und der MHC-Komplex ist gut charakterisiert. Es stehen zahlreiche monoklonale Antikörper gegen die Antigene dieser Tiere zur Verfügung. Aber auf Grund der kleinen Augen war eine orthotope penetrierende Keratoplastik lange Zeit technisch nicht möglich.

Stattdessen wurde bei Mäusen die heterotope Keratoplastik mit subkutaner Implantation der Hornhaut durchgeführt [Chandler, J.W. et al. (1983); Streilein, J.W. et al. (1982)]. Der Nachteil dieses Modelles liegt in dem voll vaskularisierten Empfängerbett, das ganz andere Voraussetzungen für eine Allograftreaktion liefert als die normalerweise bestehende Avaskularität der Hornhaut. Trotzdem zeigten die heterotopen Transplantate, daß die Hornhaut selbst immunogen ist, was lange in Frage stand. Subkutan transplantiert wird sie abgestoßen.

Bei Ratten führte man die lamelläre Keratoplastik durch [Gronemeyer, U. et.al. (1978)]. Hier ist, wie auch bei der heterotopen Keratoplastik, der Nachteil, daß der Zustand der Transplantate klinisch nur schlecht zu beurteilen ist und auch oft nicht die Hornhaut in voller Dicke transplantiert wird, so daß Informationen z.B. über das Endothel verlorengehen, die für die Keratoplastik eine große Rolle spielen.

1985 führten Williams und Coster ein neues Modell der penetrierenden Keratoplastik an der Ratte ein [Williams, K.A. und Coster, D.J. (1985)]. An diesem Modell kann die Keratoplastik bei genauer Information über den Grad der Histokompatibilität mit der am menschlichen Auge gängigen Methode durchgeführt werden. Durch das Belassen der Nähte wird die Situation am menschlichen Auge nachempfunden, an dem die Nähte ebenfalls längere Zeit nicht entfernt werden [Katami, M. (1995)]. Ein Nachteil des Modells sind anatomische Besonderheiten des Rattenauges wie eine sehr große Linse und eine sehr flache Vorderkammer, die es

in der operativen Handhabung recht anspruchsvoll machen. Dieses Rattenmodell brachte durch die mögliche Berücksichtigung immunologischer Fragestellungen einen großen Wissenszuwachs im Bereich der Hornhauttransplantation.

Seit einigen Jahren ist man technisch auch in der Lage, orthotope penetrierende Keratoplasik am Mäuseauge durchzuführen [She, S.-C. et al. (1990); Zhang, E.-P. et al. (1996)]. Die Anwendung dieses Modells soll besonders zur Klärung der Bedeutung von Major- und Minor-Histokompatibilitätsantigenen beitragen. Gegenüber dem Rattenmodell bietet sich hier eine größere Anzahl an erhältlichen Züchtungen, die ein genaueres Studium der Auswirkungen der genetischen Verschiedenheit von Spender und Empfänger erlaubt. Generell ist die Maus auf Grund ihrer weiter verbreiteten Anwendung in der Forschung besser erforscht als die Ratte. Es sind weitaus mehr monoklonale Antikörper für die Maus erhältlich, von denen die einzelnen Tiere noch dazu bei der Behandlung auf Grund ihres geringen Körpergewichts nur einen Bruchteil der Menge brauchen, die für eine Ratte nötig wäre. Die operative Handhabung bleibt aber auf Grund der Winzigkeit des Mäuseauges kompliziert.

6. Experimentelle Therapieformen

Wie bereits erwähnt, ist es noch nicht gelungen, eine in allen Fällen befriedigende Prävention bzw. Therapie der Abstoßungsreaktion nach Hornhauttransplantation zu entwickeln. Im Gegensatz zur Transplantation lebenswichtiger Organe wie Leber oder Niere rechtfertigt die Hornhauttransplantation nicht den Einsatz potentiell lebensbedrohlicher Therapien zum Erhalt des Transplantats. Dies stellt an eine mögliche immunsuppressive Therapie hohe Anforderungen hinsichtlich spezifischer Wirksamkeit ohne systemische Nebenwirkungen.

Für die Immunsuppression nach Keratoplastik werden einerseits neue hochspezifische Immunsuppressiva und andererseits topische Applikationsformen etablierter Medikamente untersucht.

Man ist also im Zusammenhang mit der Keratoplastik in hohem Maße an neuentwickelten, spezifischen immunsuppressiven Strategien interessiert.

Daneben eröffnet sich ein zweites Forschungsfeld durch die besondere Lage des Auges im Organismus: Die Hornhaut ist von außen unmittelbar zugänglich. So können unter bestimmten Voraussetzungen sonst systemisch verabreichte Medikamente lokal angewendet und an der Hornhaut immunsuppressive Effekte erzielt werden, ohne den Organismus in Mitleiden-

schaft zu ziehen. Hier ist man mit der Suche nach geeigneten Darreichungsformen befaßt, die lokal hohe Wirkspiegel bei nur geringer sytemischer Absorption gewährleisten.

6.1 Verschiedene Prinzipien der Immunsuppression – Kortikoide, kleinmolekulare Immunsuppressiva und Bioreagenzien

Das Ziel einer Immunsuppression nach Organtransplantation ist es, das Immunsystem des Spenders von der Zerstörung des Transplantates abzuhalten. Dies kann auf mehr oder weniger spezifische Weise geschehen, d.h. mit mehr oder weniger Auswirkung auf das gesamte Immunsystem bzw. den Gesamtorganismus. Das ideale Immunsuppressivum soll beim Empfänger eine Toleranz gegenüber den Transplantatantigenen bewirken, d.h. dauerhafte Akzeptanz des Fremdgewebes, ohne das Immunsystem auf Dauer zu kompromittieren und ohne Nebenwirkungen an anderen Körperzellen.

Immunsuppressiva sind mehr oder weniger unspezifisch. Das ideale Immunsupressivum soll nebenwirkungsfrei Transplantattoleranz bewirken.

Kortikosteroide und ältere Immunsuppressiva wie Azathioprin bewirken, systemisch appliziert, durch Angriff an ubiquitären Mechanismen wie Zytokinsekretion oder Störung der DNA-Replikation ausgeprägte Veränderungen am gesamten Immunsystem und an vielen anderen Körperzellen, wirken also recht unspezifisch.

Daneben existieren seit mehreren Jahren die kleinmolekularen Immunsuppressiva Cyclosporin A, FK 506, Rapamycin und Leflunomid, deren Hauptangriffsort die T-Zellen sind (s.u.).

Eine weitere Gruppe von Immunsuppressiva sind sogenannte Bioreagenzien [Soulillou J.P. (1995)], mehr oder weniger „natürliche“ Moleküle mit immunsuppressiven Eigenschaften, die sich sehr spezifisch gegen bestimmmte Zelloberflächenproteine richten. Hierzu gehören poly- und monoklonale Antikörper wie das Anti-Lymphozytenserum oder Anti-T-Zell-Antikörper, die ihre Zielzellen zerstören und damit noch vergleichsweise unspezifisch agieren. Vor kürzerer Zeit hinzugekommen sind monoklonale Antikörper und Fusionsproteine (Chimären aus Zelloberflächenproteinen und Antikörpern), die gezielt die Funktion verschiedener Zelloberflächenmoleküle blockieren, ohne die Zielzellen zu zerstören, und damit hochspezifisch in die Immunreaktion eingreifen können. Sie kommen damit dem idealen Immunusuppressivum am nächsten, haben jedoch auch Nebenwirkungen bzw. Anwendungseinschränkungen. Bioreagenzien sind Fremdeiweiße, die allergische Reaktionen auslösen können, denen zum Erhalt

der Wirksamkeit mit konventioneller Immunsuppression begegnet werden muß [Schena, F.P. (1997)]. Außerdem ist ihre Anwendung vergleichsweise sehr teuer.

6.2 Kleinmolekulare Immunsuppressiva – Cyclosporin A, FK 506, Rapamycin und Leflunomid

Cyclosporin A, FK506, Rapamycin und Leflunomid wirken im wesentlichen hemmend auf unterschiedliche Stadien der T-Zellaktivierung und haben damit einen recht spezifischen Angriffspunkt innerhalb des Immunsystems. Sie verhindern aber eine Immunreaktion meist nur für die Dauer ihrer Einnahme und in dieser Zeit blockieren sie auch alle anderen T-Zell-abhängigen Immunprozesse, was zu lebensbedrohlichen Infektionen führen kann. Außerdem haben sie substanzspezifische Nebenwirkungen wie z.B. Nephro- oder Neurotoxizität.

6.2.1 Cyclosporin A - systemisch und lokal

Cyclosporin A (CyA) ist ein sehr potentes Immunsuppressivum. Seine Anwendung hat die Transplantation parenchymatöser Organe revolutioniert.

1976 wurde erstmals berichtet, daß CyA immunsuppressive Eigenschaften besitzt. Seither konnte auf Grund seiner großen Potenz und Selektivität die Kurz- und Langzeitprognose in der Organtransplantation erheblich verbessert werden [Hess, A.D. (1994); Keown, P.A. (1994)].

CyA ist ein lipophiler Metabolit des Pilzes Tolypocladium inflatum gams. Seine immunsuppressive Wirkung beruht auf Hemmung der Expression des Interleukin-2(IL-2)-Gens.

Cyclosporin A verhindert durch Blockade der IL-2-Gen-Expression die T-Zellaktivierung. Seine Anwendung hat die Transplantationsmedizin revolutioniert.

Im Zytosol bindet CyA an sogenannte Cyclophiline. Der entstehende Komplex hindert durch Blockade der Ca^{++}-abhängigen Signaltransduktion die Protease Calcineurin an der Produktion nukleärer Bindungsfaktoren des IL-2-Gens, die für dessen Transkription nötig sind. Neben der Transkription des IL-2-Gens wird auch die des Interferon-γ (IFN-γ)- und anderer Zytokingene gehemmt [Schreiber, S.L. und Crabtree, G.R. (1992)]. Durch die Hemmung der Zytokinexpression wird die Allograftreaktion in ihrer Anfangsphase unterbunden. Es kommt nicht zur Aktivierung und Vermehrung der T-Helferzellen und auch nicht zur klonalen Expansion zytotoxischer T-Zellen [Hess, A.D. (1994); Keown, P.A. (1994)].

In verschiedenen Tiermodellen läßt sich durch Behandlung mit CyA ein Transplantatüberleben trotz MHC-Inkompatibilität erreichen, in einigen Modellen, z.B. Ratte und Schwein konnte sogar nach kurzzeitiger CyA-Behandlung die Entwicklung einer spenderspezifischen Toleranz gezeigt werden [Hess, A.D. (1994); Keown, P.A. (1994)]. Diese Erfolge ließen sich aber am Menschen noch nicht reproduzieren.

Zur Zeit ist CyA die wichtigste Säule der Immunsuppression bei fast allen Formen der Zell- und Organtransplantation. Zunehmend wird CyA auch in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten eingesetzt [Belin, M.W. et al. (1990); Keown, P.A. (1994)].

In der Ophthalmologie wird CyA systemisch zur Behandlung der endogenen Uveitis und verschiedener okulärer Manifestationen systemischer Erkrankungen eingesetzt, wie z.B. bei M. Behçet, Sjögren-Syndrom und endokriner Orbitopathie [Belin, M.W. et al. (1990)].

CyA wird systemisch z.T. nach Hochrisikokeratoplastik eingesetzt, gesucht wird aber nach geeigneten topischen Applikationsformen.

Z.T. wird CyA systemisch nach Hochrisikokeratoplastik eingesetzt [Hill, J.C. (1995); Reinhard, T. et al. (1996)]. Im allgemeinen ist aber der systemische Einsatz von CyA nach der Keratoplastik nur schwer zu vertreten, da die Gabe mit potentiell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen einhergehen kann.

Deswegen gab und gibt es viele Bemühungen, für die stark lipophile Substanz eine geeignete topische Applikationsform zu entwickeln, die hohe lokale Wirkspiegel bei geringer systemischer Absorption gewährleistet. Es wurden verschiedene Lösungsmittel [Hoffmann, F. und Wiederholt, M. (1985)] und auch Kollagen-Schilde als Träger [Pleyer, U. et al. (1993)] sowie verschiedene Formen der Verkapselung des Medikaments [Juberías, J.R. et al. (1998); Pleyer, U. et al. (1993)] versucht. Dabei stellte sich heraus, daß CyA topisch gegeben zwar beim Kaninchen das Transplantatüberleben deutlich verlängert, nicht aber bei der Ratte [Juberías, J.R. et al. (1998)]. In klinischen Studien konnte die Wirksamkeit am Menschen nicht eindeutig nachgewiesen werden [Belin, M.W. et al. (1990); Holland, E.J. et al. (1993); Reinhard, T. et al. (1996)]. Einige Studien sprechen für eine gute Wirksamkeit, aber die große Collaborative Corneal Transplantation Study konnte einen solchen Effekt nicht nachweisen [Hill, J.C. (1995); Stark, W. et al. (1992)]. Somit ist die topische Anwendung von CyA nach Keratoplastik noch nicht etabliert.

6.2.2 Tacrolimus (FK 506), Sirolimus (Rapamycin)

FK 506 und Rapamycin wurden im Tierexperiment erfolgreich zur Immunsuppresion nach Keratoplastik eingesetzt.

Zu den neueren Immunsuppressiva gehört auch FK506, ein Makrolid. Seine Wirkungsweise ist ähnlich der von CyA (s.o., 5.2.2). Es bindet an intrazelluläre Immunophiline und verhindert über Blockade der Ca^{++}-abhängigen Signaltransduktion die Zytokingenexpression. Dies führt zur Verhinderung der T-Zellaktivierung. Dabei ist FK506 zehn- bis hundertfach potenter als CyA. Wichtige Nebenwirkungen von FK506 sind neben den allgemeinen Nebenwirkungen immunsuppressiver Therapie Nephro- und Neurotoxizität sowie Diabetogenizität [Fruman, D.A. et al. (1994); Gerber, D.A. et al. (1998); Hikita, N. et al. (1997); Morris, R.E. (1995)]. Diese machen es, systemisch verabreicht, nicht zu einer Alternative nach Hornhauttransplantation. Offenbar penetriert FK506 aber bei topischer Applikation (in isotoner ophthalmologischer Suspension) die okulären Gewebe ausreichend. Im Tierversuch ist eine Wirksamkeit bei topischer Gabe ohne Nebenwirkungen durch systemische Absorption nachgewiesen [Hikita, N. et al. (1997)]. Sollte sich dies noch untermauern lassen, stellt FK506 eine Option bei der Behandlung der Immunreaktion am Auge dar. In klinischen Studien wurde FK506 am Auge noch nicht angewendet.

Rapamycin (RPM) gehört zur selben Substanzklasse wie FK506 und bindet ebenfalls in der Zelle an Immunophiline. Allerdings bewirkt es hier nicht wie CyA und FK506 die Blockade der Zytokinsynthese, sondern der Zellproliferation. Offensichtlich blockiert RPM die Wirkung von Zytokinen und einigen Wachstumsfaktoren und verhindert letztlich den Übertritt der Zellen von der G_1- in die S-Phase. Dabei ist es vermutlich gut verträglich, es befindet sich z.Zt. in klinischen Phase II-Studien. Auf Grund dieses von FK506 und CyA unterschiedlichen Wirkmechanismus ist die Kombination dieser Medikamente sinnvoll, wie sich auch im synergistischen Effekt in den Studien zeigt [Gerber, D.A. et al. (1998); Morris, R.E. (1995)].

Nach Keratoplastik wurde RPM bisher systemisch im Tierexperiment eingesetzt und führte dort zu signifikanter Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit [Pleyer, U. et al. (1998)].

6.2.3 Leflunomid

Leflunomid (LF, auch HWA 486), ein Isoxazolderivat, ist ein Prodrug mit dem aktiven Metaboliten A77 1726. Strukturell ist LF anderen Immunsuppressiva nicht verwandt [Bartlett, R.R. et al. (1991)]. Seine immunsuppressiven Eigenschaften wurden 1978 entdeckt.

Leflunomid hemmt T-Zellen vermutlich durch Blockade der Signaltransduktion und wurde außer in klinischen Studien zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis auch nach Keratoplastik im Tierexperiment erfolgreich eingesetzt.

Offensichtlich haben LF bzw. sein Metabolit mehrere Wirkorte auf subzellulärer Ebene:

Zum einen hemmt LF das Schlüsselenzyms der Pyrimidin-de-novo-Synthese, die Dihydro-orotatdehydrogenase (DHODH). Diese nach Uridingabe reversible Wirkung läßt sich an T-Lymphozyten der Maus bei relativ geringen Konzentrationen von A77 1726 nachweisen, spielt bei höheren Konzentrationen aber offensichtlich keine Rolle mehr [Bartlett, R.R. et al. (1996); Elder, R.T. et al. (1997); Halloran, P.F. (1996)].

Zum zweiten hemmt LF in relativ hohen Konzentrationen die Tyrosinphosphorylierung der Proteintyrosinkinase, die einen sehr frühen Schritt in der IL-2-abhängigen Signaltransduktion darstellt [Bartlett, R.R. et al. (1996); Elder, R.T. et al. (1997)].

Auf die T-Lymphozyten der Maus wirkt LF durch diese zwei Mechanismen antiproliferativ und hemmt deren Zytotoxizität [Elder, R.T. et al. (1997)].

Generell werden die Effekte verschiedener Zytokine durch LF stark abgeschwächt, obwohl die Zytokinproduktion durch die Substanz nicht oder kaum gehemmt wird. Dies legt nahe, daß LF die Signaltransduktion der Zielzelle stört, was z.B. durch die Hemmung der Tyrosin-kinase erklärt werden kann [Bartlett, R.R. et al. (1996)].

Ferner verhindert LF die Ädhäsion von Leukozyten am Endothel. Offensichtlich geschieht dies nicht durch verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle. Möglicherweise spielt hier ebenfalls Behinderung der Signaltransduktion eine Rolle [Bartlett, R.R. et al. (1996)].

LF hemmt die Produktion von Allo-, Auto- und Xenoantikörpern [Bartlett, R.R. et al. (1996)].

Im Tiermodell LF ist bei der Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen wirksam. Besonderes Augenmerk wird auf die Wirksamkeit von LF bei verschiedenen Arthritis-Modellen gelegt [Bartlett, R.R. et al. (1996); Halloran, P.F. (1996)]. Hier kommt es auch bereits in klinischen Phase-I-, -II- und -III-Studien bei rheumatoider Arthritis zur Anwendung, wo sich gegenüber Placebo eine Wirkung zeigte [Bartlett, R.R. et al. (1996)].

Auch in verschiedenen Transplantationsmodellen wurde LF erprobt [Bartlett, R.R. et al. (1991); Bartlett, R.R. et al. (1996), Johansen, A. et al. (1998)]. Bei der Xenotransplantation ist LF wirksamer als jedes andere immunsuppressive Agens allein. Ferner ist es in der Lage, bei der Allotransplantation ablaufende Abstoßungsreaktionen zu unterbrechen, und hat einen

deutlichen Effekt auf die sonst schwer zu behandelnde chronische Abstoßungsreaktion [Bartlett, R.R. et al. (1991); Elder, R.T. et al. (1997)].
Am Auge wurde LF im Tiermodell bisher bei der Behandlung der experimentellen Autoimmunuveitis und der Hornhauttransplantation eingesetzt [Coupland, S.E. et al. (1994); Niederkorn, J.Y. et al. (1994); Robertson, S.M. und Lang, L.S. (1994); Smith Lang, L. et al. (1992)]. Es zeigte sich eine eindeutige Wirkung im Sinne der Suppression der Autoimmunerkrankung bzw. der Verzögerung oder sogar Verhinderung der Transplantatabstoßung.

6.3 Monoklonale Antikörper

6.3.1 Allgemeines zu Wirkung und Anwendung

Monoklonale Antikörper werden von einem einzigen Zellklon produziert. Die produzierten Antikörper sind folglich identisch und binden alle am selben, genau definierten Epitop eines Antigens, haben alle die gleiche Affinität zu diesem Epitop und sind alle vom gleichen Isotyp. Sie sind also im Gegensatz zu polyklonalen Antiseren, die von verschiedenen Zellen gegen das gleiche Antigen produziert werden, in ihren Eigenschaften und bzgl. der Antigenerkennung völlig einheitlich und damit besser definiert. Da sie nur eine einzige antigene Determinante eines Antigens binden, stellt auch die Kreuzreaktivität zu anderen Antigenen, die bei polyklonalen Antikörpern oft vorhanden ist, nur selten ein Problem dar.
In vivo sind Antikörper gegen ein einziges Epitop nur in sehr geringer Menge vorhanden, da die produzierenden Zellklone nur aus relativ wenigen Zellen bestehen. Ihre Produktion in für diagnostische und therapeutische Zwecke ausreichend großen Mengen wurde möglich, als Milstein und Köhler die Fusion von antikörperproduzierenden Milzzellen mit unsterblichen Myelomzellen der Maus zu sog. Hybridomzellen gelang. Die fusionierten Zellen produzieren die monoklonalen Antikörper in Gewebekulturen, Bioreaktoren oder Aszites von Mäusen.
In der Transplantationsmedizin werden monoklonale Antikörper zur gezielten Beeinflussung der Immunantwort eingesetzt. Klinische Anwendung fanden bzw. finden poly- und monoklonale Antikörper wie das Anti-Lymphozytenserum oder Anti-T-Zell-Antikörper, die ihre Zielzellen zerstören und damit noch vergleichsweise unspezifisch agieren.
Zunehmend auch klinisch angewendet werden neuere monoklonale Antikörper gegen verschiedenste Zelloberflächenproteine, so z.B. das CD4- und CD8-Molekül und verschiedene

Zelladhäsionsmoleküle. Diese neueren Reagenzien blockieren die Funktion ihrer Zielproteine für die Dauer ihrer Bindung, die Zellen werden dabei aber nicht zerstört.
Im Tierexperiment ist Toleranzentwicklung nach Transplantation bei der Anwendung von monoklonalen Antikörpern häufiger zu beobachten, allerdings bleibt gerade die Anwendung der neueren Moleküle noch weitgehend experimentell, nicht zuletzt wegen der trotz Nebenwirkungen relativ hohen Zuverlässigkeit konventioneller Immunsupressiva [Qin, S. et al. (1990); Waldmann, H. und Cobbold, S. (1993)].

6.3.2 Anti-CD4-Antikörper

Anti-CD4-Antikörper greifen an zentraler Stelle spezifisch in der Immunreaktion ein und werden schon mit Erfolg klinisch angewendet.

CD4-spezifische monoklonale Antikörper wurden erstmals 1983 gegen die CD4-Antigene des Menschen und der Maus entwickelt [Dialynas, D.P. et al. (1983)]. Da $CD4^+$ T-Lymphozyten eine zentrale Rolle in der Transplantatabstoßung spielen (s.o., 2.1), und das CD4-Antigen nur von wenigen anderen Zellpopulationen exprimiert wird und so einen relativ spezifischen Angriffspunkt bietet, sind Antikörper gegen diese Struktur eine vielversprechende Möglichkeit zur gezielten Immunsuppression bzw. Toleranzinduktion.
Anti-CD4-Antikörper werden in der Klinik heute in der Behandlung verschiedener Autimmunerkrankungen z.T. mit Erfolg eingesetzt [Waldmann. H. und Cobbold, S. (1993)]. In der Transplantationsmedizin gibt es ebenfalls einzelne erfolgreiche Versuche bei Nieren- sowie Herztransplantation mit Anti-CD4-Antikörper aus der Maus und auch mit „humanisierten“ Antikörpern, bei denen die antigenbindenden Domänen des Maus-Antikörpers auf einen menschlichen IgG-Antikörper verpflanzt sind [Delmonico, F.L. und Cosimi, A.B. (1996)].
Am Auge werden anti-CD4-Antikörper bereits klinisch bei der Behandlung der Uveitis eingesetzt [Thurau, S.R. et al. (1994)]. Außerdem wurden sie von verschiedenen Autoren in Tiermodellen zur Behandlung der Abstoßungsreaktion nach Hornhauttransplantation erprobt. Dies erfolgte z.T. systemisch und z.T. in topischer Anwendung [Ayliffe, W. et al. (1992); Coupland, S.E. et al. (1995); He, Y. et al. (1991); Pleyer, U. et al. (1996); Williams, K.A. et al. (1992)]. Auf die Ergebnisse wird in der Diskussion detailliert eingegangen.

7. Fragestellung

Mit meiner Arbeit möchte ich zur Klärung des Mechanismus der Immunreaktion nach Keratoplastik beitragen. Die Frage nach der Effektorzelle der Abstoßung ist noch nicht befriedigend beantwortet. Mit der Antwort auf diese Frage könnte besonders bei Hochrisikokeratoplastik eher eine wirkungsvolle, für den Gesamtorganismus ungefährliche Prävention bzw. Therapie der Immunreaktion etabliert werden.

Diese Arbeit untersucht mit immunhistochemischen Methoden die die Rattenhornhaut nach Keratoplastik unter immunsuppressiver bzw. tolerogener Therapie mit CyA, LF oder Anti-CD4-Antikörpern infiltrierenden Zellen.

Es wird untersucht, wie sich durch die Therapie das Hornhautinfiltrat als immunhistologisches Korrelat zum klinisch beobachteten Erfolg der verschiedenen Therapieformen verändert. In diesen Ergebnissen werden Hinweise darauf gesucht, welchen Zellpopulationen eine zentrale Rolle in der Allograftreaktion zufällt.