

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE

Direktor: Prof. Dr. H. J. Schlitt

**DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Immunologische Konsequenzen nach Transplantation
einer adenovirale infizierten Leber im Rattenmodell**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Schneider

2008

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE

Direktor: Prof. Dr. H. J. Schlitt

**DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Immunologische Konsequenzen nach Transplantation
einer adenovirale infizierten Leber im Rattenmodell**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Schneider

2008

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Edward Geissler
2. Berichterstatter: PD Dr. Claus Hellerbrand
Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2009

Gewidmet
Meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	10
Abbildungsverzeichnis	12
A. EINLEITUNG	14
1. Lebertransplantation	14
1.1. Historischer Rückblick	14
1.2. Indikationen zur LTX	15
1.3. MELD-Score	17
2. Ischämie-/Reperfusionsschaden	18
2.1. Kalter Ischämie- /Reperfusionsschaden	18
2.2. Warmer Ischämie-/Reperfusionsschaden	19
2.3. Zellschaden im Rahmen der Ischämie und Reperfusion	20
2.4. Apoptose im Rahmen des Ischämie- und Reperfusionsschadens	22
2.5. Radikalfreisetzung als Ursache von Organschädigung	23
3. Der Ablauf der Apoptose	24
3.1. Molekulare Mechanismen der Apoptose-Signalwege	26
3.2. Morphologische Veränderungen einer apoptotischen Zelle	27
3.3. Modulatoren des Apoptoseprogrammes	28
3.3.1. bcl-2	28
3.3.2. IAPs	29
3.3.3. p53	30
4. Behandlungsoptionen im Rahmen der LTX	30
4.1. Immunmodulatoren	30
4.2. Gentherapie	31
4.3. Andere Vektoren	32
5. Adenoviren	32
5.1. Aufbau des Adenovirus	33
5.2. Funktion und Wirkmechanismus	34
5.3. Der adenovirale Vermehrungszyklus	35

6. Das Immunsystem	36
6.1. Angeborene Immunität	36
6.2. Erworbene Immunität	38
6.3. Zellen der Immunantwort	38
6.3.1. T-Zellen	38
6.3.2. B-Zellen	40
6.3.3. Natürliche Killer Zellen	41
6.3.4. Mononukleäres phagozytierendes System	42
6.3.5. Granulozyten	43
B. FRAGESTELLUNG	44
C. MATERIAL UND METHODEN	45
1. Materialien und Geräte	45
2. Ratten LTX-Modell	48
2.1. Ablauf der LTX	49
2.2. Experimentelle Gruppen	50
3. Doxycyclin-induziertes Promotor System	52
4. Apoptose-Nachweismethoden	53
5. Herstellung rekombinanter Adenoviren	53
6. Immunhistochemie	58
6.1. CD4-Antikörper	58
6.2. CD8-Antikörper	59
6.3. CD45RA-Antikörper	59
6.4. Versuchsablauf	60
7. PCR	61
7.1. Vorbereitung der Gewebeproben für die quantitative PCR	61
7.2. Quantitative real-time PCR	61
8. Statistik	62

D. ERGEBNISSE	63
1. TUNEL- Färbung zur Bewertung der Apoptoserate	63
2. Western Blot	65
3. PCR	66
3.1. Neutrophile Zellen und Makrophagen	66
3.1.1. MPO	66
3.1.2. Expression von CD163	66
3.1.3. TNF α -Expression	67
3.2. CD4-positive Zellen	68
3.3. CD8-positive Zellen	68
3.4. B-Zellen	70
4. Immunhistochemie	70
4.1. CD4	76
4.2. CD8	76
4.3. CD45RA	76
5. Exkretorische Funktion des Transplantats	77
6. Überleben der Versuchstiere	77
E. DISKUSSION	79
1. Verminderte Apoptoserate in Abhängigkeit vom Grad der bcl-2 Expression	79
2. Erhöhte bcl-2-Expression nach Transfektion mit TetOn bcl-2 Ad5 und Doxycyclin-Gabe	80
3. Modifizierte Immunantwort des Empfängers nach Transplantation einer adenoviral-infizierten Leber und bcl-2-Expression	81
4. Positiver immunhistochemischer Nachweis einer geringeren Immunantwort in mit bcl-2 behandeltem Rattenlebergewebe	84

F. ZUSAMMENFASSUNG	87
LITERATURVERZEICHNIS	89
DANKSAGUNG	99
CURRICULUM VITAE	100
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	102

Abkürzungsverzeichnis

Deutsch:

ADT	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Apaf-1	Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor 1
APC	Antigen-präsentierenden Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BZR	B-Zellrezeptor
CHE	Cholinesterase
CRP	Capsel-reaktives Protein
DAB	Diamino-Benzidin
dCMP	Desoxy-Cytidin-5'-Monophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein Barr Virus
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyt-Colony stimulierender Faktor
GdCl ₃	Gadolinium-Chlorid
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Colony stimulierender Faktor
GOT	Glutamat-Oxalazetat-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAdV	Humane Adenoviren
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LAMP-Protein	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LTX	Lebertransplantation
MPO	Myeloperoxidase
NF-κ	Nuklear-Faktor -κ
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OLT	Orthotope Lebertransplantation
PS	Phosphatidylserin
PTK	Proteintyrosinkinasen
RNS	Reaktive Nitrogen-Spezies
SEC	Sinusoidale Endothelzellen
SOD	Superoxiddismutase
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

tDT	Desoxynukleotidyl-Transferase
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl Transferase
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor -α
TZR	T-Zell-Rezeptor
UW-Lösung	University of Wisconsin-Lösung

Englisch:

AIDS	Acquired Immuno Deficiency
ANOVA	Analysis of variance
ANT	Adenine Nucleotide Translocator
AP-1	Activator Protein 1
ARDS	Acute Respiratory Distress-Syndrome
Bak	Bcl-2 Homologous Antagonist Killer
Bax	Bcl-2-associated X Protein
Bcl-2	B-cell Lymphoma -2
Bid	BH3 Interacting Domain
Bik	Bcl-2 Interacting Killer
CARD	Caspase Recruitment Domain
CAR-Receptor	Coxsackie Adenovirus-Receptor
CD	Cluster of Differentiation
c-FLIP	Cellular FLICE-Inhibitory Protein
CTP-Score	Child-Turcotte-Pugh-Score
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DHHS	Department of Health and Human Service
DISC	Death Inducing Signaling Complex
ELAS	Eurotransplant Liver Allocation System
EPX	Eosinophile Peroxidase
FADD	Fas-associated Protein with Death Domain
FAS	Fibroblast-associated Antigene
FCS	Fetal Calf Serum
FFU	Flourescence Forming Units
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HSD	Honest Significant Difference
IAP	Inhibitor of Apoptosis
INR	International Normalized Ratio
ITR	Inverted Terminal Repeats

KIR	Killer Immunoglobulin-like Receptors
LDLT	Living Donor Liver Transplantation
MAC	Membrane Attack Complexe
MBP	Major Basic Protein
MCS	Map and Multiple Cloning Site
MELD	Model of End-Stage Liver Disease
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLP	Major Late Promotor
MOI	Multiplicity of Infection
MP	Methyl Palminate
mRNA	messenger Ribonucleine-Acid
PAF	Platlet Activating Factor
PAMPs	Pathogen-associated Molecular Patterns
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCD	Programmed Cell Death
PCR	Polymerasechainreaction
PNF	Primary Nonfunction
PTP	Permeability Transition Pore
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Real-time PCR
rtTA	Reverse Tetracycline-controlled Transactivator
SD	Standard Deviation
SMAC	Supramolecular Activation Cluster
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TMR	Tetramethyl-rhodamine
TRADD	TNF-receptor-associated Death Domain Protein
TRAIL-Ligand	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRE	Tet Response Element
TUNEL	Terminal Desoxynucleotidyl Transferase-mediated dUT nickend Labeling
UW-Solution	University of Wisconsin Solution
VDAC	Voltage-Dependent anion channel
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Indikationen zur LTX
Abb. 2: Kontraindikationen zur LTX
Abb. 3: Gewebeschaden infolge kalter/ warmer Ischämie
Abb. 4: Schematische Darstellung der Apoptose
Abb. 5: Extrinsischer und mitochondrialer Induktionsweg der Apoptose
Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer apoptotischen Zelle
Abb. 7: Mitglieder der IAP-Familie
Abb. 8: Das Adenovirus
Abb. 9: Transkriptionskarte
Abb. 10: Aufbau des T-Zell-Rezeptors
Abb. 11: Materialien und Geräte
Abb. 12: Ratten-LTX-Modell
Abb. 13 : Tetracyclin-abhängiges System (Tet-System)
Abb. 14: pTRE2
Abb. 15: pAdEasy-1
Abb. 16: pAdTrack
Abb. 17: Schematische Darstellung des AdEasy-Systems nach Vogelstein
Abb. 18: Primersequenzen
Abb. 19: TUNEL-gefärzte Leberschnitte
Abb. 20: TUNEL-positive Zellen/mm²
Abb. 21: Western Blot Analyse
Abb. 22: Quantitative RT-PCR
Abb. 23: T- und B-Zellakkumulation. Bestimmung der Gewebeinfiltration von T-Zellen mittels quantitativer RT-PCR von CD4 und CD8
Abb. 24a: Thymus: positiv-Kontrolle
Abb. 24b: Thymus: negativ-Kontrolle
Abb. 25: CD4-Antikörper: Verdünnung 1:100; Inkubation über Nacht bei 4°C
Abb. 25a: Tier Nr. 27, CD4-Antikörper
Abb. 25b: Tier Nr. 37, CD4-Antikörper
Abb. 25c: Tier Nr. 62, CD4-Antikörper
Abb. 26: CD8-Antikörper: Verdünnungsverhältnis 1:20, Inkubation 1h bei RT
Abb. 26a: Tier Nr. 27, CD8-Antikörper
Abb. 26b: Tier Nr. 67, CD8-Antikörper
Abb. 26c: Tier Nr. 37, CD8-Antikörper
Abb. 27: CD45RA-Antikörper: Verdünnung 1:25; Inkubationszeit von 30min bei 37°C
Abb. 27a: Tier Nr. 14, CD45RA-Antikörper
Abb. 27b: Tier Nr. 67, CD45RA-Antikörper
Abb. 27c: Tier Nr. 68, CD45RA-Antikörper
Abb. 28: Kaplan-Meier-Darstellung der Überlebensrate der Versuchstiere

A. EINLEITUNG

Für viele Patienten mit irreversiblen Leberschäden stellt die Transplantation des Organs die letzte Möglichkeit einer kurativen Therapie ihrer Erkrankung dar (Sargent and Wainwright 2006). Dennoch können in der Transplantationsmedizin nur in seltenen Fällen Organe eingesetzt werden, die für den Körper nicht als fremd erkennbar sind (z.B. von eineiigen Zwillingen, autologes Knochenmark). Daher steht die Forschung vor der schwierigen Aufgabe, die Immuntoleranz gegenüber dem körperfremden Organ zu erhöhen, ohne die Abwehr gegenüber Infektionen zu schwächen. Eine Komplikation stellt dabei der Gewebeuntergang des transplantierten Organs infolge Ischämie- und Reperfusionsschäden dar (Strasberg, Howard et al. 1994; Anaya-Prado, Toledo-Pereyra et al. 2002). Dabei ist das Gewebe einem Apoptose-induzierenden Zellstress ausgesetzt. Dieser Zelluntergang soll mittels bcl-2, einem humanen antiapoptotisch wirkenden Protein, das in allen Zellen des Körpers exprimiert wird, unterdrückt bzw. vermindert werden. Diese These stellt die Forderung nach einer verminderten Abstoßung des Organs nach Transplantation und somit nach einer erhöhten Überlebenschance für Patienten nach einer erfolgten Transplantation.

1. Lebertransplantation

1.1. Historischer Rückblick

Nach tierexperimentellen Vorarbeiten Mitte der 50er Jahre erfolgte die erste Lebertransplantation (OLT) beim Menschen in Denver (USA) im Jahre 1963 von Thomas E. Starzl (Starzl, Marchioro et al. 1965). Das Ergebnis dieser ersten Operation war zunächst wenig ermutigend, da der Patient, ein dreijähriges Kind mit einer angeborenen Gallengangsatresie vier Stunden nach Reperfusion der Leber noch intraoperativ an den Folgen einer unstillbaren Blutung verstarb (Starzl, Marchioro et al. 1963) (Welch 1955). Vier Jahre später gelang selbigem Chirurgen die erste wirklich erfolgreiche Transplantation mit einem Überleben des Patienten von über einem Jahr (Starzl, Iwatsuki et al. 1982). Nach weiteren Tierexperimenten erfolgte die weltweit zweite Lebertransplantation 1968 in Cambridge/ England, begründet durch R.Y.Calne (Calne and Williams 1968; Calne, Williams et al. 1968; Calne and Williams 1977). Die wissenschaftlichen Tätigkeiten der Arbeitsgruppe um

Calne leistete v.a. an der Entwicklung immunsuppressiver Konzepte, insbesondere bei der klinischen Anwendung von Cyclosporin A einen entscheidenden Beitrag (Calne, White et al. 1978). Die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A wurde bald mit Kortikosteroiden und Azathioprin kombiniert, womit die Rate an akuten und chronischen Reaktionen bedeutend verringert und somit das Überleben der Patienten verbessert werden konnte (Starzl, Klintmalm et al. 1981). Die erste Leber in Deutschland wurde 1969 in Bonn von Gütgemann transplantiert (Gütgemann, Schriefers et al. 1969). Nach Verbesserung von Medikation und Operationstechniken konnten auch entscheidende Fortschritte in der Organkonservierung erreicht werden. Um Problemen wie kurze Ischämietoleranz oder schlechte Primärfunktion der Transplantate nach Perfundierung nach Organentnahme mit gekühlter Glucose- und Ringerlactatlösung entgegenzuwirken (Starzl, Marchioro et al. 1963; Gütgemann, Lie et al. 1975), wurden Mitte der 70iger die Organe in Collins-Lösung konserviert. Damit wurde die Ischämietoleranz der Spenderorgane auf 6 bis 10 Stunden verlängert, wodurch ein Organtransport auch über längere Strecken möglich wurde (Benichou, Halgrimson et al. 1977). So hat sich bis heute die OLT als erfolgreiches standardisiertes Therapiekonzept bei fortgeschrittener terminaler Leberinsuffizienz etabliert (Carithers 2000).

1.2. Indikationen zur LTX

Die Leber hat aufgrund ihrer zentralen physiologischen Funktionen eine essentielle Bedeutung für die Lebensfähigkeit eines Organismus. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Regulierung der Verstoffwechselung von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten, sowie in der Speicherung von Glykogen, Fetten und fettlöslichen Vitaminen. Durch die Fähigkeit zur Biotransformation werden z.B. Fremdstoffe entgiftet und Hormone aktiviert oder inaktiviert. In den Hepatozyten werden wichtige Leberenzyme wie beispielsweise GOT, GPT, CHE, γ -Glutamyltransferase, alkalische Phosphatase und LDH gebildet. Die Bedeutung der Leber wird durch seine vielfältigen Aufgaben auch als immunologisches Organ bei der unspezifischen Abwehr, als Säure-Base-Regulator in der Harnstoffsynthese und als Gallensäurenproduzent für die Verdauung klar.

Zusammenfassend wird so die Notwendigkeit einer intakten Leber für das Überleben eines Organismus ersichtlich. Bisher gibt es noch kein Verfahren, welches die

Funktion der Leber im Falle einer Parenchymenschädigung übernimmt, wie es zum Beispiel mit Hilfe der Dialyse möglich ist, extrakorporal die Nierenfunktion zu ersetzen. Folglich ist die Lebertransplantation das einzige kurative Therapieverfahren bei Leberversagen. Folgende Tabelle nach den „Leitlinien zu Lebertransplantation im Transplantationszentrum Regensburg“ soll einen zusammenfassenden Überblick über die wichtigsten oben genannten Indikationen und Kontraindikationen zu Lebertransplantation liefern:

Abb. 1: Indikationen zur LTX

Zirrhose	Metabolische/ hereditäre Erkrankungen	Nicht resektable Lebertumore	Akute/ Fulminante Leberversagen
Äthyltoxisch	Morbus Wilson	HCC	Morbus Wilson
Primär biliar	α-1-Antitrypsin-Mangel	Gallengangs-CA	Toxisches Leberversagen
Primär/ sekundär sklerosierende Cholangitis	Familiäre Hypercholesterinämie	Karzinoide	
Biliäre Atresie	Hämochromatose	Polyzystische Lebererkrankungen	Akute Hepatitis (Hepatitis A, B, C bzw. kryptogen)
Zystische Fibrose	Caroli-Syndrom		Budd-Chiari Syndrom
Posthepatische Zirrhose	Glykogenspeichererkrankungen		Trauma
Autoimmunhepatitis	Tyrosinämie		
Kryptogene Zirrhose	Gallengangsatresie		
	Kongenitale Cholestase		

Abb. 2: Kontraindikationen zur LTX

Absolute Kontraindikationen	Relative Kontraindikationen
Extrahepat. maligne Tumoren oder Lebermetastasen eines extrahepat. Malignoms	Schwere Infektionen, Sepsis, Multiorganversagen
HCC mit extrahepatischen Metastasen	Stark reduzierter Allgemeinzustand
Non-Compliance des Patienten	Fortgeschrittene kardiopulmonale Erkrankungen
Manifester Drogen-/ Alkoholabusus	Schwerde Neurologische/ Psychiatrische Erkrankungen
Akutes Leberversagen mit Hirnödem	Biologisches Alter > 65 Jahre
Technische Inoperabilität aufgrund mesenterialer und portal-venöser Thrombosen	HIV

1.3. MELD-Score

Mittels eines prognostischen Modells soll die Schwere einer Lebererkrankung im Bezug auf Hoch- und Niedrig-Risiko-Patienten eingeschätzt werden. 1998 wurde die vom amerikanischen ‚Department of Health and Human Service‘ gestellte Forderung nach einer Verteilung der zu transplantierenden Organe anhand der Dringlichkeit bzw. dem Schweregrad der Erkrankung durchgesetzt, sodass seitdem nicht mehr nur die Länge der Wartezeit ausschlaggebend ist. Die Zahl von Todesfällen auf der Warteliste sollen auf diese Weise weiter reduziert werden (Portnoy, Miller et al. 2007). Neben etwas älteren Modellen wie der Child-Einteilung (CTP) (Pugh, Murray-Lyon et al. 1973) und dem Rosen- und Markmann Score (Markmann, Gornbein et al. 1999; Rosen, Madden et al. 1999) ist heute der MELD-Score für eine gute Differenzierung von Krankheitsbildern am besten geeignet (Yu, Ahmed et al. 2001). Seit Dezember 2006 hat dieser als Basis der Zuteilung von postmortalen Spenderlebern das bisher gültige ‚Eurotransplant Liver Allocation System‘ (ELAS) ersetzt. Der MELD-Score basiert auf lediglich 3 Parametern, die von Wissenschaftlern der ‚Mayo Clinic‘ in den USA als die zuverlässigsten Prädiktoren des Verlaufs einer schweren, transplantationspflichtigen Lebererkrankung und damit der relativen Schwere der Krankheit und der erwarteten verbleibenden Lebensdauer herausgefiltert wurden (Krom 1986). Der MELD-Score wird mit Hilfe von Serum-Kreatinin und -Bilirubin sowie des INR berechnet (Kamath, Wiesner et al. 2001; Kamath and Kim 2007). Die ermittelten Laborwerte werden in folgende Formel eingesetzt (Wiesner, McDiarmid et al. 2001):

$$\begin{aligned} \text{MELD} = & [0.957 \times \ln(\text{Serum-Kreatinin mg/dl}) \\ & + 0.378 \times \ln(\text{Serum-Bilirubin mg/dl}) \\ & + 1.120 \times \ln(\text{INR}) \\ & + 0.643] \times 10 \end{aligned}$$

Folgende Regeln müssen bei der Verwendung der Formel berücksichtigt werden:

- 1 ist der kleinste Wert für alle Variablen
- Das Serum-Kreatinin darf maximal bei 4 mg/dl liegen
- Der MELD-Score endet bei einem Wert von maximal 40

In einer Studie um das Team von Wiesner wird bei Patienten mit einem Score < 9 eine 3-Monats-Mortalität von 1,9% beschrieben, während ein Score von 40 in einer 3-Monats-Mortalität von 71,3% resultiert (Wiesner, Edwards et al. 2003).

2. Ischämie-/Reperfusionsschaden

Die resultierende Schädigung des Transplantates als Folge der Exposition gegenüber Phasen der warmen und kalten Ischämie sowie der Reperfusion mit Blut im Empfängerorganismus wird als Ischämie-Reperfusionsschaden bezeichnet. Ein ausgeprägter Ischämie-Reperfusionsschaden kann eine Transplantat-Dysfunktion zur Folge haben (Ploeg, D'Alessandro et al. 1993) und stellt mit einer Inzidenz von 22% (Ploeg, D'Alessandro et al. 1993) ein schwerwiegendes Problem in der Transplantationsmedizin dar (Anaya-Prado, Toledo-Pereyra et al. 2002). Damit verbunden sind erhöhte Sterberaten und Organversagen, langfristige Funktionsstörungen und Organabstoßung häufig innerhalb der ersten 3 Monate nach Transplantation (Howard, Klintmalm et al. 1990; Ploeg, D'Alessandro et al. 1993; Kiuchi, Schlitt et al. 1997). Im Rahmen der Organtransplantation muss man verschiedene Arten von Ischämien unterscheiden (Gujral, Bucci et al. 2001). Während die warme Ischämie bei Traumen, Schock und Transplantationen auftritt, wird die kalte Ischämie bewusst verursacht, um metabolische Prozesse während des operativen Eingriffes und der Zeit der Organkonservierung bis zur völligen Funktion im neuen Organismus zu minimieren. Neben Organtransplantationen tritt der Ischämie-/Reperfusionsschaden auch bei Herzinfarkt, Schlaganfall und Bypass-Operationen auf (Fan, Zwacka et al. 1999). Auch die Zeitspanne, die die Zellen der Ischämie ausgesetzt sind wirkt, sich auf deren Funktion aus.

2.1. Kalter Ischämie- /Reperfusionsschaden

Das Prinzip der Organkonservierung basiert auf der Reduktion der Stoffwechselaktivität, was durch Absenken der Temperatur auf 0 bis 4°C zur Konservierung erzielt werden kann. Hierdurch wird der Metabolismus entsprechend der Van't Hoff-Gleichung verlangsamt (Belzer and Southard 1988; Singer and Bretschneider 1990). Dennoch ist die Phase der Hypothermie während der Konservierungsphase des Organs zu einem großen Teil für den Ischämie-/Reperfusionsschaden verantwortlich. Für die ablaufenden Stoffwechselprozesse in der Phase der kalten Ischämie wird mehr Energie benötigt als synthetisiert werden kann (Harvey, Iu et al. 1988). Die metabolische Aktivität im Organ ist dabei hinabgesetzt, was zu einem Substrat- und ATP-Verlust führt.

Die Arbeitsgruppe um Sorrentino untersuchte den ATP-Gehalt isolierter Hepatozyten und maß nach 24 bzw. 48 Stunden in 4°C kalter UW-Lösung einen Abfall um 50% bzw. 70% (Sorrentino, Van Ness et al. 1991). Diese Lösung wird seit 1990 trotz seiner hohen Handelspreise als die erste Wahl für die Leberkonservierung gehandelt (D'Alessandro, Kalayoglu et al. 1990), da sie entscheidende hochenergetische Phosphate zur Regeneration des ATP enthält.

Durch den ATP-Mangel und die starke Abkühlung des Transplantats kann die energieabhängige membranständige Na^+/K^+ -ATPase nicht mehr funktionieren und das intrazelluläre Milieu gerät durch diese passive Störung sehr schnell in ein folgenreiches Ungleichgewicht (Raison 1973). Auch die Unterbrechung der Blutzufuhr und der damit verbundene Sauerstoffmangel an sich verursacht innerhalb kürzester Zeit eine Hypoxie der Leber, wodurch ebenfalls die Bildung von ATP durch oxidative Phosphorylierung im Zytochromsystem der Mitochondrien nicht mehr gewährleistet ist. Diese Stilllegung der Ionenpumpe führt zu einer intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Akkumulation und somit zu einer Senkung des Membranpotentials. Um dieses entstandene Konzentrationsgefälle auszugleichen gelangen Cl^- -Ionen zusammen mit Wasser entlang dem Gradienten in die Zellen und verursachen ein Zellödem, dessen Ausmaß von der Hypothermie-Sensitivität der Na^+/K^+ -ATPase abhängig ist (Martin, Scott et al. 1972). Dieses Phänomen wird als ‚No-reflow‘ beschrieben, da selbst bei Wiedereinsetzen der Perfusion nach Anschluss des Organs im neuen Organismus der kapilläre Widerstand im Endstrombett deutlich erhöht ist und damit weniger Blut die Kapillaren erreicht (grahamMenger, Steiner et al. 1992).

Eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase ist ebenfalls Ergebnis des I/R-Schadens und führt im Zellinneren durch Aktivierung hydrolysierender Enzyme wie Phospholipasen und Proteasen zur Schädigung des Organs (Romanque, Uribe et al. 2005).

2.2. Warmer Ischämie-/Reperfusionsschaden

Auch die zwischen Kaltkonservierung und Reperfusion im neuen Organismus liegende warme Ischämiezeit hat einen negativen Einfluss auf die spätere Organfunktion (Kamiike, Burdelski et al. 1988; Cisneros, Guillen et al. 1991) und kann von dem Transplantat zeitlich gesehen deutlich kürzer toleriert werden als die kalte Ischämiezeit (Jaeschke 1998). Jedoch scheint die Dauer speziesabhängig zu

sein, da im Rattenmodell die Rattenlebern bei warmer Ischämie kaum mehr als 30 Minuten viabel waren (Morimoto, Kusumoto et al. 1991), während die menschliche Leber Ischämiezeit von 60 Minuten toleriert (Delva, Camus et al. 1989; Cisneros, Guillen et al. 1991). Wie schon im Falle des kalten Ischämieschadens beschrieben, ist eine Konsequenz der warmen Ischämiezeit die Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr mit dem Erliegen des aeroben Stoffwechsels und der ATP-bildenden Atmungskette als weitere Folge. Hierbei ist besonders der Elektronentransport in der Atmungskette betroffen, wogegen der Protonentransport und das Energiekopplungssystem weitgehend unbeeinflusst bleiben (Baumann, Bender et al. 1989). Zusammenfassend wirkt sich die warme Ischämiezeit auf die Endothelzellen mit einem massiven Schaden aus, was negative Effekte auf die Mikrozirkulation der reperfundierte Leber zur Folge hat (Rauen, Noll et al. 1994; Xiong, Hu et al. 2000).

2.3. Zellschaden im Rahmen der Ischämie und Reperfusion

Das Leberparenchym ist im Rahmen der Ischämie und Reperfusion durch eine Reihe morphologischer Veränderungen gekennzeichnet, wobei es sich um einen Antigen-unabhängigen entzündlichen Prozess handelt, der zu akuter und chronischer Gewebeabstoßung führen kann (Bilbao, Contreras et al. 1999; Ke, Lipshutz et al. 2006).

Wie oben beschrieben, ist von den postischämischen Parenchymenschäden in erster Linie das Endothel betroffen, was wiederum Adhäsion und Akkumulation von Leukozyten und Blutplättchen zur Folge hat (Jaeschke 1996; Husted and Lentsch 2006; Jaeschke and Hasegawa 2006). Dies löst eine transendothiale Emigration von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe aus und triggert dort Aktivierungsreaktionen, wie z.B. die Ausschüttung zytotoxischer Degranulationsprodukte, die die endothiale Barrierefunktion zerstören (Hernandez, Grisham et al. 1987). Damit können Flüssigkeit und Makromoleküle ins Interstitium eindringen, wodurch sich der interstitielle Druck erhöht und die Versorgung mit nutritiven Substanzen bzw. die Entsorgung saurer Stoffwechselprodukte weiter verschlechtert wird (Gullo and Berlot 1996). In einer Studie von Menger und Steiner wurde dieses Verhalten der Leukozyten bereits nach einer 30 minütigen Ischämiezeit gemessen (Menger, Steiner et al. 1992). Diese aktivierten Zellen und das umgebene

geschädigte Endothel bilden als Reaktion freie Sauerstoffradikale (s.u.), die weitere schädigende Wirkungen zur Folge haben und so ein Circulus vitiosus entsteht.

Des Weiteren hat diese Blutmangelversorgung Auswirkung auf die sternförmigen Makrophagen in der Leber, die sogenannten Kupffer-Zellen. Etwa 15 Minuten nach Reperfusion werden sie aktiviert (Caldwell-Kenkel, Currin et al. 1991) und produzieren daraufhin freie Sauerstoffradikale (s.u.), sowie eine Vielzahl an Mediatoren, wie Eikosanoide, PAF, Hydrolase, Zytokine (IL-1, IL-6 usw.), die zu einer weiteren leukozytären Aktivierung beitragen (Nolan 1981; Decker 1990).

Im Elektronenmikroskop fand man auf der Suche nach intakten sinusoidalen Endothelzellen (SEC) heraus, dass intermittierendes Abklemmen und ischämisches Präkonditionieren während der Transplantation den Ischämie-/Reperfusionsschaden durch eine Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation und einer verminderten Aktivität von Kupffer-Zellen reduziert (Vajdova, Heinrich et al. 2004). Eine andere Möglichkeit zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens mit den Kupffer-Zellen als Angriffspunkt stellt die Therapie mit Glycin dar. Untersuchungen von Rentsch wiesen den Effekt von Glycin auf Kupffer-Zellen im Vergleich zu Gadolinium-Chlorid (GdCl_3) und Methyl Palminate (MP) nach. Nicht durch eine Zerstörung der Makrophagen, sondern lediglich durch eine Modulierung der Zellen wurde das Gewebe äußerst wirksam präventiv vor intrahepatischem Zelltod und Gewebeuntergang geschützt (Rentsch, Puellmann et al. 2005). Dennoch ist eine völlige Eliminierung bzw. Ausschaltung der Kupffer-Zellen nicht sinnvoll, da eine intakte physiologische Funktion in der frühen postischämischen Phase notwendig ist, um beispielsweise entstandene Endotoxine effektiv zu eliminieren (Bouwens, De Bleser et al. 1992).

Die Hypothese, dass Komplementfaktoren an der postischämischen Aktivierung der Kupffer-Zellen beteiligt sind wurde in der Studie um Jaeschke und sein Team diskutiert und bestätigt (Jaeschke, Farhood et al. 1993). Zusätzlich zu den zellulären Komponenten des hepatischen Ischämie-/Reperfusionsschadens vermittelt die Aktivierung der klassischen und alternativen Komplementkaskade die Bildung eines ‚membrane attack complexes‘ (MAC) (Esser 1994). Dabei werden Blutproteine gebunden, die über einen Komplex an der Zellmembran in das Zellinnere gelangen und es so kleinen Molekülen wie Wasser oder Ionen ermöglichen, sich frei in oder außerhalb der Zelle zu bewegen. Diese gestörte Osmolalität endet schnell in einem Zelltod (Jaeschke, Farhood et al. 1993; Straatsburg, Boermeester et al. 2000). Hepatozyten dagegen bleiben selbst nach langer kalter Konservierung viabel, relativ

unbeeinflusst der anschließenden Reoxygenierung. Ihre Schädigung erfolgt in erster Linie durch die oben beschriebenen Endothel- und Kupffer-Zell-bedingten Mikrozirkulationsstörungen (Kukan and Haddad 2001; Shimizu, Miyazaki et al. 2001).

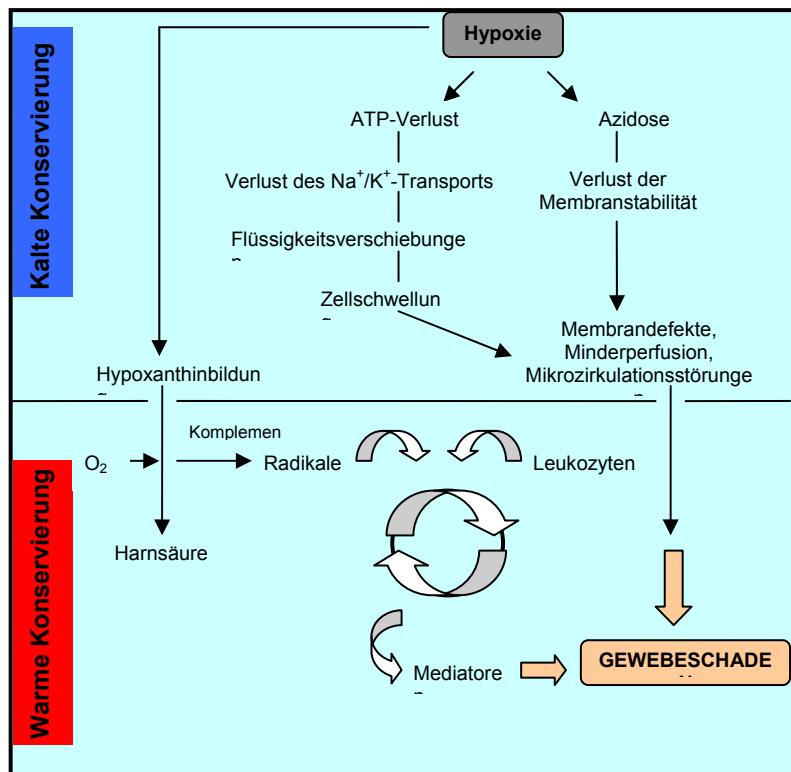


Abb. 3: Gewebeschaden infolge kalter/ warmer Ischämie (Post and Messmer 1996)

In der Abbildung werden 2 mögliche Wege je in Abhängigkeit von kalter oder warmer Konservierung des Organs beschrieben, die ursächlich für einen Gewebeschaden sein können. Auf der einen Seite steht das Zellödem, welches gemäß den Gesetzen der Osmose infolge des Elektrolytungleichgewichtes entsteht, auf der anderen die Azidität des Zellmilieus. Beide Wege resultieren in einer Mikrozirkulationsstörung mit einem hypoxischen Gewebeschaden als Endergebnis. Auch durch Radikalfreisetzung im Rahmen der Oxidation von im Purinstoffwechsel anfallenden Hypoxanthinen werden Gewebeschäden verursacht.

2.4. Apoptose im Rahmen des Ischämie- und Reperfusionschadens

Entscheidender Faktor für die Auslösung des Apoptoseprogrammes im Rahmen der Ischämie und Reperfusion ist die Dauer der Minderversorgung des Gewebes (PNF) (Gollackner, Sedivy et al. 2000). Apoptotische Vorgänge im Gewebe sind neben der Art der Aufbewahrung bis zur Transplantation und der Reperfusion auch von der partiellen Ischämie bzw. Manipulation während der Transplantat-Entnahme und der Implantation im Empfänger abhängig. Gerade die zelleigenen natürlichen

Mechanismen wie die Apoptoseinduktion bzw. -Inhibierung bieten neue potentielle Angriffspunkte für therapeutische Strategien im Rahmen der Verbesserung der Organannahme nach Transplantation (Clavien, Harvey et al. 1992). Durch eine gezielte selektive Inhibition der Apoptose wird eine starke Reduktion der Organschädigung auf dem Boden von Ischämie und Reperfusion erreicht. Dies ist durch eine Überexpression von bcl-2 im Lebergewebe möglich, die durch einen adenoviral gesteuerten bcl-2-Transfer vermittelt wird. Nachdem die Arbeitsgruppe um Bilbao nach diesem Modell bereits eine signifikante Verminderung der Transaminasen, Nekrose und Apoptose nachweisen konnte, dürfte dieser Mechanismus auch für den Ischämie-Reperfusionsschaden nach Transplantation gelten (Bilbao, Contreras et al. 1999).

2.5. Radikalfreisetzung als Ursache von Organschädigung

Bei der Entstehung der Radikale spielen intra- und extrazelluläre Pathomechanismen eine entscheidende Rolle. Der während der Zeit der Gewebeischämie stattfindende Abbau von ATP über ADP zu AMP führt zu einer Ansammlung von Adenosin. Für die Reutilisation des Adenosins fehlt jedoch in der ischämischen Phase der für die O₂-abhängige Phosphorylierung Sauerstoff, sodass das überschüssige Adenosin in den Purinbasenabbau eingeschleust wird. Dabei reichert sich das Abbauprodukt Hypoxanthin intrazellulär an, das unter weiterhin sauerstoffarmen Bedingungen nicht zu Xanthin umgewandelt werden kann. In der Phase der Reoxygenierung des Gewebes erfolgt dann ein rascher Umsatz des Hypoxanthins über die Xanthinoxidase zu Xanthin (Granger 1988). Bei dieser Reaktion fallen reaktive Sauerstoffprodukte an (McCord and Roy 1982), denen eine entscheidende Beteiligung an der Entstehung und am Ausmaß des Ischämie-/Reperfusionsschadens zugeschrieben wird (McCord 1987). Grund dafür ist der an die Phase der Reoxygenierung anschließende Beginn einer Kaskade zerstörerischer Entzündungsreaktionen durch redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF-κ B oder AP-1 (May and Ghosh 1998), reaktive Produkte H₂O₂, O²⁻ (Marzi, Walcher et al. 1993), sowie die Induktion proinflammatorischer Mediatoren wie bestimmte Zytokine (TNF-α, IL-1, IL-6) (Rao, Falk et al. 1997), Chemokine und Eikanoide (McCord 1985; McCord 1987; Carlos and Harlan 1994; May and Ghosh 1998). Apoptose und Organdefekt sind die unausweichlichen Folgen dieser Entzündungsreaktionen (Fan,

Zwacka et al. 1999; Nieuwenhuijs, De Brujin et al. 2006). Für die frühe Phase der Organschädigung etwa 0,5 bis 4 Stunden nach Beginn der Reperfusion wird die Bildung der Sauerstoffradikale durch Kupfferzellen verantwortlich gemacht (Jaeschke and Farhood 1991), auf die eine Neutrophilenaktivierung folgt, die für die spätere Neutrophilen-induzierte Entzündungsreaktion als ein entscheidender Faktor beschrieben ist (Jaeschke, Bautista et al. 1991).

3. Der Ablauf der Apoptose

Der Begriff Apoptose, abgeleitet aus dem griechischen "Abfallen" (ἀπόπτωσις: apo = ab, weg los; ptosis = Senkung) wurde 1972 von J. F. Kerr und A. H. Wyllie geprägt (Kerr, Wyllie et al. 1972) und beschreibt einen programmierten, organisierten Ablauf innerhalb einer Zelle mit dem Ziel des nicht-entzündlichen Zelltodes, der von A. Saraste mit einer Gesamtdauer von 12 bis 24 Stunden festgelegt wurde (Saraste 1999). In ihrer Veröffentlichung von 1972 beschreiben Kerr und Wyllie apoptotische Vorgänge als einen natürlichen Prozess im Gewebe und eine physiologischen Notwendigkeit, die eine lebenswichtige Grundlage (Kataoka and Tsuruo 1996; Kiess and Gallaher 1998) weitere biologischer Prozesse wie Gewebehomöostase, Tumorregression und Lyse infizierter Zellen darstellt (Kerr, Wyllie et al. 1972; Kam and Ferch 2000). Die Balance zwischen Tod und Überleben der Zelle ist im gesunden Organismus streng kontrolliert und so haben eine Vielzahl extra- und intrazellulärer Mediatoren die Aufgabe, diese aufrechtzuerhalten (s.u.) (Steller 1995). Die Apoptose unterliegt strengen Signaltransduktions- und Regulationsmechanismen, beispielsweise reguliert durch pro- und anti-apoptotische Proteine der bcl-2-Familie wie bax, bak, bik, bcl-xL, bcl-xS usw., die den Zelltod für überflüssige oder geschädigte Zellen induzieren (Earnshaw 1995; Reed 1996; Huang, O'Reilly et al. 1997).

Neben diesem programmierten Zelltod, der nur die ausgewählte Zelle betrifft, existiert ein nekrotischer Zelluntergang, der das umliegende Gewebe dieser nekrotischen Zelle in den Entzündungsprozess miteinbezieht. Eine Verletzung des Gewebes und damit die Schädigung der Plasmamembran löst eine Zellnekrose aus, die aufgrund eines homöostatischen Ungleichgewichtes die Zelle durch einen Überschuss an Wasser gemäß den Regeln der Osmose zum Platzen bringt. Dies erlaubt den Zellbestandteilen in den Extrazellulärraum zu gelangen und dort mit

freigesetzten Enzymen weitere Zellen des Parenchyms und Stromas zu schädigen und eine Entzündungskaskade mit dem Einwandern von inflammatorischen Mediatoren auszulösen. Apoptose kann durch intrazelluläre Induktion oder auch von extern ausgelöst werden. Interne Gründe können Zellstress oder Schädigung des Erbgutes sein. Extern kann sie z.B. durch T-Killer-Zellen oder NK-Zellen ausgelöst werden, wenn diese erkennen, dass die Zelle von einem Virus befallen ist oder aus anderen Gründen ‚unnormal‘ ist. Ist die Zelle über Reize und intrazelluläre Signaltransduktionen einmal stimuliert und die Informationen zum Zellkern weitergeleitet, so tritt die Zelle in den irreversiblen Ablauf der Apoptose ein (Wernig and Xu 2002). Wenn eine Zelle keine Überlebenssignale mehr erhält wird ebenfalls Apoptose ausgelöst. Eine übermäßige Stimulation zur Apoptose kann jedoch die Entstehung von Krankheitsbildern wie Herzinfarkt, AIDS und neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Huntington erheblich begünstigen (Canu and Calissano 2003). Eine zu niedrige Apoptoserate tritt dagegen besonders bei malignen Zellen auf, was sich in einer erhöhten Proliferationsrate der Tumorzellen widerspiegelt. Mutation proapoptotischer Gene in eine inaktive Form oder Überexpression anti-apoptotischer Faktoren bewirken eine Apoptose-Defizienz, die von grundlegender Bedeutung bei der Entstehung von Resistenzen beispielsweise gegenüber Zytostatika oder anderen immuntherapeutischen Ansätzen sein kann (Igney and Krammer 2002). Greift das Immunsystem in den programmierten Zelltod ein und hemmt die Apoptose, so würden autoreaktive B- und T-Zellen das Überleben der eigentlichen Zielzelle ermöglichen und so Ursache oder Beginn einer autoimmunologischen Funktionsstörung sein (Kataoka and Tsuruo 1996; Mahoney and Rosen 2005).

Der Verlauf der Apoptose wird in vier Phasen eingeteilt, die jeweils durch charakteristische morphologische Korrelate bestimmt werden (Abb. 4). Die intakte Zelle erhält zunächst das Signal (1). Daraufhin kommt es zur Entscheidungsfindung (2) (Kulkarni and Cronin). In der nächsten Phase (3) folgt der Ablauf des apoptotischen Programms mit Schrumpfen der Zelle und des Zellmaterials und dem Zerfall in membrangebundene Vesikel (Kiess and Gallaher 1998). Schließlich werden die verbleibenden apoptotischen Restkörper von umgebenden Zellen durch Phagozytose aufgenommen (4).

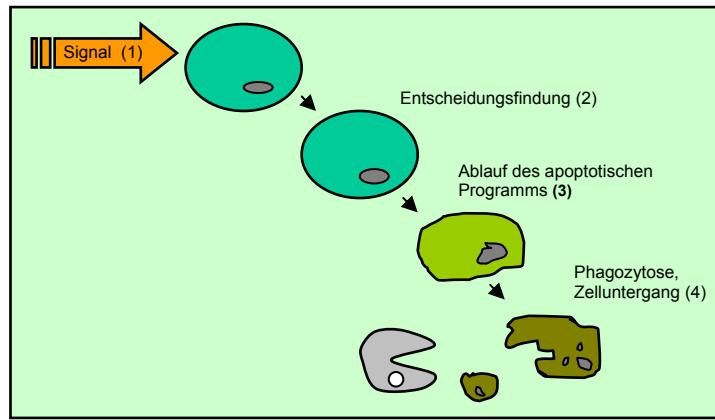


Abb. 4: Schematische Darstellung der Apoptose

3.1. Molekulare Mechanismen der Apoptose-Signalwege

Apoptotische Signalwege münden in der Aktivierung von Caspassen, die die zentralen Enzyme der Apoptose darstellen. Caspassen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden (‘Cysteinyl-Aspartate-Cleaving Proteases’). Die Aufgaben der Proteasen erstrecken sich auf folgende Bereiche:

- Die Aktivierung von Caspassen, die mit der Ausbildung des apoptotischen Phänotyps korreliert (Earnshaw, Martins et al. 1999).
- Die Proteolyse von Proteinen, die selektiv mit Beginn der Apoptose gespalten werden und in die Ausbildung des Phänotyps der apoptotischen Zelle involviert sind (Earnshaw, Martins et al. 1999).
- Die Herabsetzung der enzymatischen Aktivität von Caspassen durch spezifische Inhibitoren, die die Apoptose verhindern können (LaCasse, Baird et al. 1998).

Die Caspase-Familie umfasst 14 Mitglieder, die in Säugetieren identifiziert und von denen 12 Enzyme im Menschen gefunden wurden. Caspassen lassen sich aufgrund ihrer mit Hilfe einer Peptidbibliothek bestimmten Substratspezifität in Initiator-, Effektor- und exekutive Caspassen einteilen. Bei der Aktivierung der Caspase-Kette unterscheidet man zwischen zwei Hauptwegen: der eine verläuft in Abhängigkeit von Mitochondrien (= intrinsischer Signalweg) (Korsnes, Hetland et al. 2006), der andere durch Interaktion mit einem ‚Todesrezeptor‘ (= extrinsischer Signalweg), der mit seinen Liganden interagiert (Schattenberg, Galle et al. 2006).

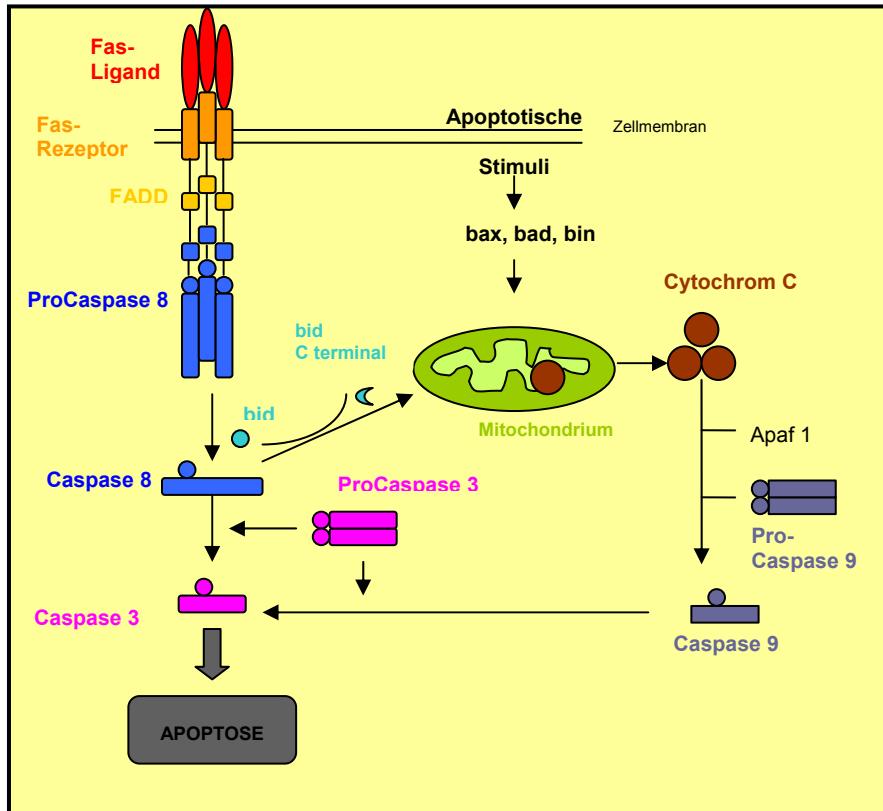


Abb.5: Induktionswege der Apoptose

a) Extrinsischer Signalweg:

Durch Interaktion von (Fas-) Liganden, Rezeptoren, oder auch TNFa mit einer ‚Death Domain‘ (DD) auf der Zelloberfläche kommt es zur Ausbildung eines ‚Fas-associated Death Domain Protein‘ (FADD). Der Ablauf der Apoptose kann nun durch die aktivierte Caspase 8 einerseits direkt durch Spaltung der Effektor-Caspasen 3 erfolgen. Zum anderen führt die Spaltung des Proteins Bid zur Aktivierung des intrinsischen, mitochondrialen Signalweges (Kroemer and Martin 2005).

b) Intrinsischer Signalweg:

Interne Todessignale wie DNA-Schädigung, Wachstumsfaktorenentzug (Thompson 1995) oder Verlust des Kontaktes zur extrazellulären Matrix initiieren das programmierte Absterben dieser Zelle. Abhängig vom Übergewicht pro- oder antiapoptotischer bcl-2-Proteine entscheidet sich an der äußeren Membran des Mitochondriums, ob das Apoptosesignal inhibiert oder amplifiziert wird.

3.2. Morphologische Veränderungen einer apoptotischen Zelle

Nach erfolgreicher Transduktion des Todessignals über einen der oben beschriebenen Signalwege, unterliegt die Zelle irreversiblen morphologischen Veränderungen. Charakteristika einer in den Vorgang der Apoptose eingetretenen Zelle sind Zellschrumpfung, Kondensation von Chromatin und internukleosomale Fragmentierung von DNA und Auflösung der Plasmamembran (Sen 1992; Kiess and

Gallaher 1998). Die Spaltung der zelleigenen DNA in definierte Fragmente (Kataoka and Tsuruo 1996) erfolgt hierbei durch Endonukleasen (Saraste 1999) in dabei entstehende zunächst 800 kDa schwere DNA-Fragmente, die in weiteren Schneidungsvorgängen in 400 kDa, dann 200 kDa usw. gespalten werden (Wyllie 1980). Gleichzeitig verdichtet sich das Chromatin im Zellkern, der Zellinhalt kondensiert und Nukleosom-Units werden gebildet (Sen 1992; Kataoka and Tsuruo 1996). Die Zellmembran schnürt sich ein, und es kommt zur Ausbildung apoptotischer Restkörper, kleiner membranumhüllter Vesikel, die von benachbarten Zellen phagozytotisch aufgenommen werden können. Die apoptotischen Restkörper bleiben stets membranumhüllt, sodass kein Zellinhalt freigesetzt wird. Da die Zellmembran dabei nicht geschädigt wird, kommt es im Gegensatz zur Nekrose nicht zu einer Entzündungsreaktion.

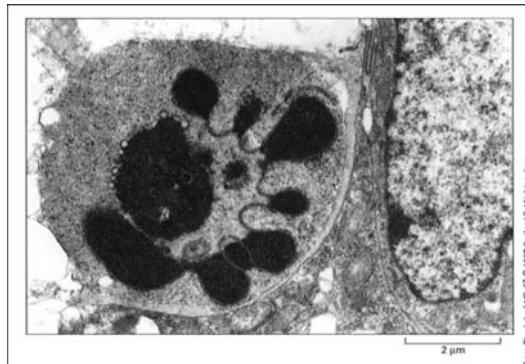


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer apoptotischen Zelle nach Alberts, B. u.a. Molekularbiologie der Zelle, VCH, Weinheim, 1997

3.3. Modulatoren des Apoptoseprogrammes

3.3.1. bcl-2

Als erstes Mitglied einer Apoptose-regulierenden Genfamilie wurde bcl-2 1984 identifiziert (Tsujimoto, Finger et al. 1984). Aufgrund von Sequenzhomologien oder Wechselwirkungen wurden im Laufe der Zeit verwandte Proteine als Mitglieder dieser bcl-2-Familie definiert (Chao and Korsmeyer 1998). Nach ihrer Aktivität werden diesen wie oben erläutert pro- (bax, bak, bcl-XS, bad, bid, bik, hrk u.a.) und anti-apoptotische (bcl-2, bcl-XL, bcl-w, Mcl-1, A1 u.a.) Effekte zugeschrieben, mit denen sie auf den mitochondrialen Apoptoseweg einwirken (Gross, McDonnell et al. 1999). In humanen Zellen liegt physiologischer Weise ein gleiches molares Verhältnis zwischen diesen gegensätzlich wirkenden Proteinen vor, sodass eine

Zelle ihren geregelten Zellzyklus durchlaufen kann (Oltvai, Milliman et al. 1993). Anti-apoptotische bcl-2-Proteine sind innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Viele pro-apoptotische Mitglieder der Familie, wie z.B. bid oder bad liegen hingegen zytosolisch oder lose an Membranen assoziiert vor, während wieder andere wie bcl-Xs und bax erst nach Aktivierung in der mitochondrialen Membran lokalisiert werden können (Gross, McDonnell et al. 1999). Eine wichtige Eigenschaft der bcl-2-Familie besteht in der Fähigkeit zur Bildung von Homo- und Heterodimeren mit anderen Familienmitgliedern. Proteine wie bcl-Xs und bad entfalten ihre pro-apoptotische Wirkung durch kompetitive Dimerisierung mit anti-apoptotischen Proteinen. So kommt es im Falle eines bcl-2-Überschusses zur Bildung von bcl-2-Homodimeren und damit zur Hemmung der Apoptose.

3.3.2. IAPs

Bei dem IAP-Protein (Inhibitor of Apoptosis Protein) handelt es sich um eines der körpereigenen Regulator-Proteine, die den unkontrollierten Zelltod verhindern sollen. Es wurde 1993 entdeckt und als erstes in Viruszellen identifiziert (Crook, Clem et al. 1993; Birnbaum, Clem et al. 1994). Das Protein enthält charakteristische BIR-Domänen (baculovirus IAP repeat), die N-terminal mit dem IAP-Protein verbunden sind und hauptsächlich zur Stabilisierung und Regulation der Inhibition beitragen (Verhagen, Kratina et al. 2006). Einer der effektivsten Caspase-Inhibitoren unter den IAPs ist XIAP. XIAP besteht aus drei BIR-Domänen und einem RING-Finger und bewirkt mit diesen eine Inhibition der Caspasen 3 und 7 (vgl. Abb. 7).

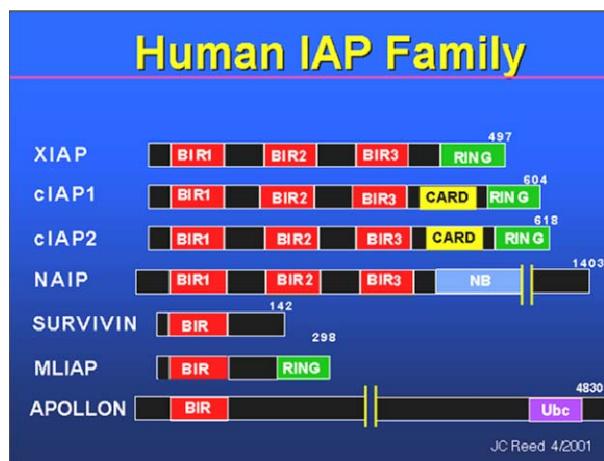


Abb. 7: Mitglieder der IAP-Familie

3.3.3. p53

Das Tumorsuppressorgen p53 gehört zu den zentralen Steuereinheiten von Proliferation und Wachstum in der Zelle (Lokshin, Tanaka et al. 2005; Lim, Lim et al. 2006) (Lim, Lim et al. 2006). Studien belegen, dass das zelluläre Level von p53 die Reaktion der Zelle bestimmt. So resultieren niedrigere Level in einem Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase (Yonish-Rouach, Choisy et al. 1996), während höhere Level Apoptose zur Folge haben (Chen, Ko et al. 1996). Es wird durch Zellstress oder DNA-Schädigung nach Bestrahlung oder Chemotherapie aktiviert. Nachdem p53 in der Zelle das Signal gegeben hat, läuft ein mehrstufiges Programm ab, bei dem unter anderem bestimmte Enzyme, die so genannten Caspasen (s.o.), den natürlichen Zelltod in Gang bringen ((Sunyach, Alfa Cisse et al. 2006). Mutationen und funktioneller Verlust dieses Proteins sind eng mit der Entstehung maligner Tumoren assoziiert (Chen, Ko et al. 1996). So kann man in über 50% aller soliden Tumore Mutationen von p53 nachweisen (Mayelzadeh and Martinez 2006). Es vermittelt seine Funktion hauptsächlich durch transkriptionelle Aktivierung p53-responsiver Gene. Folge der Aktivierung von p53 ist das Verbleiben der Zelle in der G1- bzw. G2-Phase des Zellzyklus und/oder die Induktion von Apoptose. Zusätzlich ist p53 Ziel viraler Onkoproteine (Strano, Dell'orso et al. 2006) und spielt eine entscheidende Rolle in der DNA-Reparation, der Transkription und der Genom-Stabilität (Choisy-Rossi, Reisdorf et al. 1998).

4. Behandlungsoptionen im Rahmen der LTX

4.1. Immunmodulatoren

Im Rahmen einer Transplantation werden die Patienten zum Schutz des Transplantats vor einer „Graft-versus-host-Reaktion“ mit immunsupprimierenden Medikamenten wie zum Beispiel Cyclosporin A, Azathioprin, Cyclophosphamid, Tacrolimus sowie Glukokortikoiden behandelt. Neben ihrer gewünschten immunsupprimierenden Wirkung sind sie aber auch für eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen verantwortlich. Eine Studie von Losada beschreibt eine deutlich erhöhte Infektionsanfälligkeit von insgesamt 73,1% nach Lebertransplantation v.a. gegenüber Bakterien mit 49,7%, Viren mit 35,5%, Pilzen mit 10,1% und anderen gemischten Infektionsquellen mit 4,5% (Losada, Cuervas-Mons et al. 2002). Aufgrund der weitgehend unspezifischen Suppression des gesamten Immunsystems

wird daneben eine Anhäufung von Zweittumoren und Metastasenbildung beobachtet (Penn 1996). Daher erweist sich eine einseitige Therapie nur mit Immunsuppressiva nach einer Lebertransplantation für Patient und transplantiertes Organ als problematisch, sodass es sinnvoll erscheint neuere Therapiekonzepte zum Schutz des Transplantats zu finden, die nicht das gesamte Abwehrpotential des Immunsystems schwächen.

4.2. Gentherapie

Gentherapie ist definiert als das Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieses Gens einen therapeutischen Nutzen zu bewirken (Hallek, Buening et al. 2001). Abhängig davon, ob Zellen im Reagenzglas oder direkt im Organismus transformiert werden, unterscheidet man zwischen einer Gentherapie *ex vivo* und *in vivo* (Gunzburg and Salmons 1996). Wird das veränderte Gen in eine Eizelle oder ein Spermium transferiert, so spricht man von Keimbahn-Gentherapie. Wird das Gen jedoch in die Parenchymzellen eines Organs eingeschleust, wird das als somatische Gentherapie bezeichnet. Als dafür besonders geeignetes Verfahren hat sich der virale Transfer als sehr einfach und effizient bewährt, wobei Retro- und Adenoviren zu den am besten untersuchten viralen Vektoren zählen (Jolly 1994). Ein idealer Vektor für eine Gentherapie nach einer Lebertransplantation sollte zielorientierte, hoch effiziente und langfristige Wirkungsmechanismen aufweisen und frei von erheblichen Noxen sein (Sun, Anand-Jawa et al. 2003). Adenovirale Vektoren sind dabei in der Lage ein vielseitiges Kollektiv von Zelltypen zu infizieren, z.B. Hepatozyten, Myoblasten, Gliazellen, Makrophagen, respiratorische Epithelzellen.

Studien der Arbeitsgruppe um Sandig erbrachten bereits 1996 hervorragende Ergebnisse für gentherapeutische Behandlungserfolge am Beispiel des Gentransfers retroviraler und adenoviraler Vektoren in Hepatozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Dabei machten sie sich die Eigenschaften der einzigartigen Rezeptoren auf der Zellmembran der Hepatozyten zunutze (Sandig and Strauss 1996). Für den Transfer der retroviralen Vektoren existieren derzeit verschiedene Methoden, bei denen auf der einen Seite *ex vivo* gentherapeutisch veränderte Hepatozyten in das Zielorgan implantiert werden und auf der anderen Seite retrovirale Vektoren *in vivo* appliziert werden. Im Gegensatz dazu bieten adenovirale Vektoren eine attraktive Alternative

für eine Gentherapie. Sie sind ebenfalls nicht spezifisch für bestimmte Gewebe und infizieren nicht nur sich-teilende Zellen, sondern auch im Zellzyklus arretierte Zellen (Stratford-Perricaudet, Levrero et al. 1990). Das Genom der Adenoviren geht nach einer geringen Anzahl von Zellteilungen verloren und wird nicht wie im Falle der Retroviren in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Dabei hat sich gezeigt, dass Adenoviren sehr effizient für eine Gentherapie in Hepatozyten *in vitro* und *in vivo* sind (Stratford-Perricaudet, Levrero et al. 1990), sodass eine Infektionsrate von über 95% erzielt werden kann.

4.3. Andere Vektoren

Neben oben genannter Verfahren der virusvermittelten Gentherapie existieren Methoden eines nicht-viralen Systems zur Gentherapie. Besonders die hohe Expressionsrate einzigartiger Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Hepatozyten macht diese zu einem idealen Ziel für die endosomale Aufnahme von Makromolekülen (Wu and Wu 1987). Ein Gentransfer mittels Liposomen stellt wiederum einen alternativen Weg für eine DNA-Übertragung für Hepatozyten dar. Dennoch scheint dieses Verfahren durch die Aktivität der Kupffer-Zellen limitiert zu sein (Ghosh and Bachhawat 1991). Neben diesem gentherapeutischen Verfahren gibt es noch zahlreiche weitere Methoden, die einen Transfer von Zielgenen erlauben. Dazu zählen der Beschuss von Partikeln, ‚jet-Injektion‘ und die direkte Injektion von DNA (Furth, Shamay et al. 1992). Ob eine Gentherapie egal welcher Methode erfolgreich ist, zeigt sich in der Expressionsrate des übertragenen Transgens. Diese hängt von mehreren Faktoren ab, zu denen beispielsweise die Integration des Vektors bzw. des Genoms in die Wirts-DNA, die Stabilität des Gens und der Grad der Zellteilungen gehören.

5. Adenoviren

Adenoviren wurden 1953 von Rowe und Mitarbeitern bei Untersuchungen an Tonsillen (Adenoiden) entdeckt (Rowe, Huebner et al. 1957). Sie werden in zwei große taxonomische Gruppen eingeteilt: einmal in die Familie der Mastadenoviren, die verschiedene Virusspezies der Säugetiere umfassen und auf der anderen Seite in die Aviadenoviren, welche, wie der Name schon sagt (lat. Avis = der Vogel), die

bei den Vögeln vorkommenden Typen beinhalten (Norrby, Bartha et al. 1976). Die humanen Adenoviren, die zu den Mastadenoviren zählen, werden in sechs Subgruppen eingeteilt (A-F) (Roelvink, Lizonova et al. 1998), insgesamt sind jedoch ca. 51 Subtypen bekannt (Madisch, Wolfel et al. 2006).

5.1. Aufbau des Adenovirus

Typisch für den Aufbau eines Adenovirus ist die charakteristische ikosaedrische Form bei einem Durchmesser von 60 - 90 nm (van Oostrum and Burnett 1985). Das adenovirale Capsid wird aus mehr als 1500 Polypeptiden von sieben verschiedenen Molekülen in einer symmetrischen Anordnung gebildet (Nasz and Adam 2006) und wiegt insgesamt etwa 150×10^6 Da. Es besitzt 3 rotationssymmetrische Achsen, in denen weitere verschiedene Symmetrie-Typen und -Systeme gefunden werden können. Diese kristallähnliche Konstruktion erklärt die flachen Facetten und scharfen Kannten, die für Adenoviren charakteristisch und zudem funktionell sehr wichtig sind (Burnett 1985; Nasz and Adam 2006) (Abb. 8). Im Inneren des Capsids befindet sich die doppelsträngige lineare DNA mit einer Länge von ca. 36kb (Davison, Benko et al. 2003). Während die einen Viren in manchen Fällen zusätzlich zu der Proteinhülle noch eine Hüllmembran besitzen, können andere aber auch „nackt“ vorliegen, zu denen die Adenoviren zählen. Die äußere Proteinhülle beinhaltet 240 Hexon-Capsomere und 12 Pentone. Die Spitze des Capsids wird durch ein Penton gebildet, das einen Komplex aus 2 Proteinen enthält, einer pentametrischen Base und einem trimetrischen Fiberprotein. Die antennenartigen Fiberproteine sind durch eine Capsomer-Basis an der Oberfläche verankert und verleihen den Adenoviren ein satellitenartiges Erscheinungsbild. Zur äußeren Stabilisierung enthält das Capsid noch weitere Komponenten, die Proteine IIIa, VIII und IX, die die Hexone und Pentone an ihren entsprechenden Positionen zusammenhalten (Fabry, Rosa-Calatrava et al. 2005). Im Inneren des Ikosaeders befindet sich das sog. Core, das durch bestimmte Interaktionen mit den Capsid-Proteinen kommuniziert. Als Core wird die adenovirale DNA bezeichnet, die etwa 36.000 Basenpaare enthält, die jeweils am 5'-Ende mit einem terminalen 55 kDa schweren Protein verbunden sind (Robinson, Younghusband et al. 1973; Rekosh, Russell et al. 1977). Neben Ad2 und Ad12 ist die DNA-Sequenz des Ad5 bis heute genau entschlüsselt (Chroboczek, Bieber et al. 1992; Sprengel, Schmitz et al. 1994), welcher mit einer Genomlänge von 36 kb

besitzt es eine Aufnahmekapazität von ungefähr 1,8 – 2,0 kb fremder DNA (Bett, Prevec et al. 1993), was man sich in der Gentherapie zur Nutze macht.

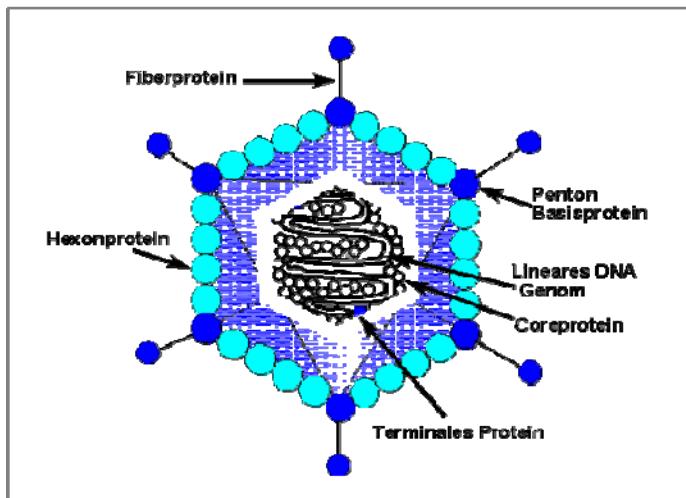


Abb. 8: Das Adenovirus nach (Moore, Horikoshi et al. 1996)

5.2. Funktion und Wirkmechanismus

Das Penton-Capsomer des Adenovirus enthält alle notwendigen Komponenten für das Andocken des Virus an den Wirt. Nach der initialen Anlagerung durch die Domäne des Fiberproteins interagieren die Pentonbasisproteine mit zellulären Intergrinen durch ihren C-terminalen Arginin-Glycin-Asparagin-Rest (Gollackner, Sedivy et al. 2000; Fabry, Rosa-Calatrava et al. 2005; Zubieta, Blanchoin et al. 2006; Douagi, McInerney et al. 2007). Dies hat zur Folge, dass der Viruspartikel sich mit der Zellmembran der Zielzelle in den Wirt einstülpft. In dieser Phase spricht man dann von einem Endosom. Unter dem sogenannten ‚uncoating‘ versteht man die Freisetzung des Virus-Core in das Cytoplasma, worauf die virale DNA über Kernporen in den Zellkern des Wirtes eindringen kann (Greber, Suomalainen et al. 1997; Puntel, Curtin et al. 2006). Die Synthese neuer Adenoviren erfolgt vollständig bereits im Zellkern der Wirtszelle und so entstehen pro Zyklus und Zelle 10^4 bis 10^5 Viren. Die eigentliche Zelle verkümmert binnen 30 bis 40 Stunden durch die Infektion und setzt entgegen ihrer ursprünglichen Funktion neu synthetisierte Virionen frei.

5.3. Der adenovirale Vermehrungszyklus

Das virale Chromosom wird in fünf frühe (early) (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4), zwei verzögert frühe (IX und IVa2) und eine späte Transkriptionseinheit unterteilt, aus der fünf mRNA Subfamilien (L1-L5) hervorgehen (Sawada, Raska et al. 1988; Boulanger and Blair 1991). Die Phasen werden auf Ebene der Transkription reguliert und enden mit der Zelllyse. In der frühen Phase des Infektionszyklus entsteht das E1A-Gen, das durch Aktivierung einer Expressionskaskade auf die Expression der anderen frühen viralen Gene (E1B, E2, E3, E4) wirkt. Das primäre Ziel der frühen Genproduktion ist, die Zellen für eine effiziente virale Replikation vorzubereiten.

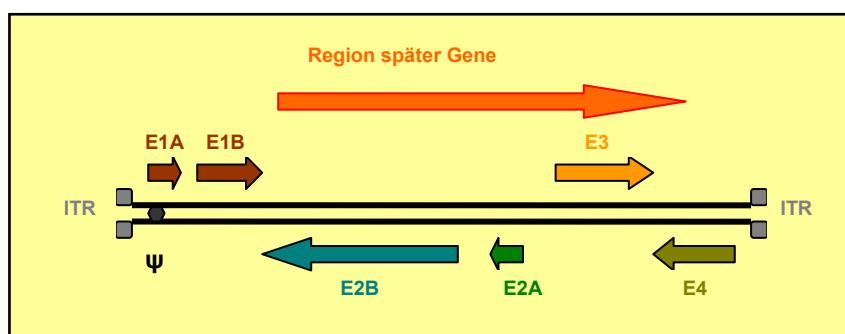


Abb. 9: Transkriptionskarte

Zu Beginn der Infektion bindet eine Bindungsdomäne an den entsprechenden Rezeptor auf der Zelloberfläche, den sogenannten CAR-Rezeptor (Bergelson, Cunningham et al. 1997). E1A blockiert die Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems, um dem Virus ein ungestörtes Eindringen die Wirtszelle zu ermöglichen. Zusätzlich sorgt es für die Herstellung einer optimalen Umgebung für die Virusreplikation und induziert damit die S-Phase. Durch die Bindung des E1B an p53 wird die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verhindert (Sieber and Dobner 2007). Die E2-Region, unterteilt in E2A und E2B, kodiert für Proteine, die direkt in den Vorgang der DNA-Replikation involviert sind (Liu, Naismith et al. 2003). Somit ist sie maßgeblich an der Synthese viraler Genprodukte für die DNA-Replikation beteiligt. An beiden Enden wird das Adenovirus-Genom von zwei inversen terminalen Repetitionen (ITR) mit einer Länge von 100 bis 165 Basenpaaren flankiert (Wolfson and Dressler 1972), an denen die DNA-Repetition initiiert wird. Unmittelbar neben dem linken ITR ist die Verpackungssequenz ψ lokalisiert, die aus sieben AT-reichen Sequenzwiederholungen aufgebaut ist und während der viralen Replikation die Verpackung der DNA in die Kapside steuert.

(Hearing, Samulski et al. 1987). Die E4-Region ist essentiell für die Amplifikation der sogenannten ‚templates‘. Zusammen mit E3 unterstützt es die Synthese viraler Genprodukte, indem sie die antiviralen Verteidigungsstrategien des Organismus blockiert. Shepard betonte in seiner Studie die Bedeutung von E4 im Hinblick auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zelle und der Unterdrückung der wirtseigenen DNA-Replikation (Shepard and Ornelles 2004).

Auf diese frühe Transkriptionsphase folgt die DNA-Replikation, die späte (late-) Phase des Zyklus, in dem die Regionen L1 bis L5 kodiert werden. Der Transkriptionsstart findet am ‚major late promotor‘ (MLP) statt (Young 2003). Die Gene des späten Zyklus kodieren überwiegend für Strukturproteine des ikosaedrischen Virions. Dieser produktive Zyklus des Virus führt letztendlich zur Lyse der infizierten Wirtszelle (1984). Die Rolle der weiteren L3-, L4- und L5-Regionen sind noch nicht völlig geklärt. Dennoch ist klar, dass mit Hilfe der anderen Regionen das neue Virus fertig gestellt wird. Nach einigen Stunden ist der produktive Zyklus des Virus beendet, neue Viruspartikel werden freigesetzt um andere Zellen zu infizieren, während die Wirtszelle zugrunde geht.

6. Das Immunsystem

6.1. Angeborene Immunität

Das angeborene, *innate* Immunsystem bekämpft erfolgreich den größten Teil unserer Infektionen, noch bevor das erworbene Immunsystem aktiviert wird. Es ist für die frühe Erkennung von Pathogenen und deren Elimination verantwortlich (Boneca, Dussurget et al. 2007; Delneste, Beauvillain et al. 2007). Dennoch aktiviert und interagiert es mit dem erworbenen Immunsystem über Makrophagen, dentritische Zellen (Granucci, Feau et al. 2003) und Zytokine (Belknap, Giguere et al. 2007).

Durch eine limitierte Zahl an Rezeptoren (pattern recognition receptors PRRs) erkennen angeborene Immunzellen körperfremdes Material und werden durch sog. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) aktiviert. Nach Durchdringen der Epitheloberfläche stößt der Krankheitserreger auf Phagozyten der Monozyten-/Makrophagen-Zellreihe. Phagozyten produzieren Signale zur Triggerung weiterer Immunreaktionen (Brennan, Delaney et al. 2007) und dienen der Eliminierung niedermolekularer, körperfremder Xenobiotika und auch körpereigener Substanzen, die nicht mehr weiter verwertbar sind. Nach ihrem spezifischen Wirkort, z.B. in der

Leber, repräsentieren die sternförmigen Kupffer-Zellen eine zum mononukleären Phagozytensystem gehörende Makrophagenart, die sich aus Monozyten differenziert (Naito, Hasegawa et al. 2004). Natürliche Killerzellen sind Leukozyten, die die Fähigkeit besitzen, Veränderungen auf der Oberfläche von Zellen zu erkennen, z.B. eine Virusinfektion oder bösartige Entartung. Als Reaktion auf einen Gewebeuntergang und Entzündungen im Rahmen der Immunreaktion kommt es zu einer rapiden Erhöhung der Akute-Phase-Proteine im Serum (Shrive, Metcalfe et al. 1999). Das C-reaktive Protein bindet auf der Bakterienoberfläche an mikrobielle Polysaccharide und exponierte Liganden und aktiviert so das Komplementsystem (Diaz Padilla, Bleeker et al. 2003; Suresh, Singh et al. 2006).

Das Komplementsystem besteht aus einer Gruppe von etwa 20 Serumproteinen hepatischen Ursprungs und stellt circa 4% der Plasmaproteine dar. Seine Komponenten reagieren untereinander sowie auch in Wechselwirkung mit anderen Bestandteilen des Immunsystems. Die Aktivierung des Faktors C3 über die C3-Convertase spielt dabei die zentrale Rolle (Kerr 1980). Nach einer kaskadenartigen Aktivierung durch Mikroorganismen (alternativer Komplementweg) oder durch Antikörper (klassischer Komplementweg) entstehen verschiedene Peptide mit folgenden Wirkungen:

- Opsonierung: Vorbereitung von Mikroorganismen zur Phagozytose.
- Chemotaxis: Anlockung von Phagozyten zum Infektionsort.
- Verstärkung der Durchblutung am Reaktionsort und erhöhte Kapillarpermeabilität für Plasmamoleküle.
- Schädigung der Plasmamembranen von Zellen, Viren oder Organismen durch welche die Aktivierung induziert wurde. Dies kann zur Zellzerstörung führen.

Als Interferone bezeichnet man eine Gruppe von Proteinen, die eine wichtige Rolle bei viralen Infektionen spielen (Zhu, Huang et al. 2007). Interferon γ wird von aktivierten T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK) produziert und verursacht die stärkste Induktion von Klasse-II-Molekülen auf Gewebszellen (Makino, Maeda et al. 2006). Die antivirale und antiproliferative Wirkung von Interferon α und Interferon β ist jedoch stärker. Interferone werden sehr früh im Verlauf einer Infektion gebildet und sind die erste Abwehrlinie gegen viele Viren (Douagi, McInerney et al. 2007).

6.2. Erworbene Immunität

Wenn Zellen der angeborenen Immunität den Infektionserreger nicht erkennen und somit nicht phagozytieren können, benötigt das Immunsystem Antikörper, die den Kontakt zwischen infektiösem Agens und Phagozyten vermitteln (Megiovanni, Sanchez et al. 2006). In diesen Fällen wird das erworbene Immunsystem aktiviert. So dürfen das angeborene und erworbene Immunsystem nicht als isoliert arbeitende Systeme betrachtet werden. Beispielsweise können z.T. erst durch Antikörper markierte Erreger zur Phagozytose erkannt werden, oder es sind Lymphokine für die Stimulation und damit effektive Zerstörung von Infektionserregern nötig (Yamamoto, Kuramoto et al. 1988).

6.3. Zellen der Immunantwort

Hauptvertreter des komplexen Systems einer Immunantwort sind die B- und T-Zellen. Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten Stammzellen ab, die sich in zwei Gruppen differenzieren lassen (Hoobeke, De Smedt et al. 2006) :

- Die lymphatische Reihe, aus der B- und T-Lymphozyten hervorgehen.
- Die myeloische Reihe, aus der Phagozyten (Monozyten), neutrophile Granulozyten und andere Zellen entstehen.

Lymphozyten und andere Leukozyten exprimieren sehr viele verschiedene Moleküle auf der Zelloberfläche. Während einige von ihnen nur kurzzeitig während bestimmter Phasen oder nach Aktivierung erscheinen, sind andere Moleküle konstant vorhanden und typisch für ihre Zellreihe. Derartig konstant exprimierte Antigene werden als Marker benutzt (Dudziak, Kamphorst et al. 2007). Als einheitliche Nomenklatur für Zelloberflächenmarker wird das CD-System verwendet. Die CD-Moleküle sind dabei spezifisch für das Entwicklungsstadium und die Art einer Zelle und können so von entsprechenden monoklonalen Antikörpern erkannt und nachgewiesen werden.

6.3.1. T-Zellen

T-Zellen sind thymusabhängig und werden in diesem Organ zu immunologisch kompetenten Lymphozyten geprägt. Sie vermehren sich klonal und sind durch ihre parakrine Produktion von Löslichkeitsfaktoren, die anderen Immunzellen bei deren

Erkennung helfen sollen, von enormer Bedeutung (Callan, Tan et al. 1998). Ihre Funktion als großer Bestandteil des Immunsystems ist durch ihre spezifischen, klonal verteilten, hoch polymorphen Antigenrezeptoren definiert (Acuto and Reinherz 1985), die es ihnen ermöglichen, zellgebundene Antigene zu erkennen und zu binden.

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein Heterodimer aus zwei transmembranen Glykoproteinketten, einer α - und einer β -Kette, die über Disulfidbrücken miteinander in Verbindung stehen und jeweils über eine konstante Domäne (C-Domäne) mit der Zelle verankert sind (Meuer, Hussey et al. 1982; Allison, Ridge et al. 1984; Yanagi, Yoshikai et al. 1984). Variable Domänen (V-Domänen) bilden die Antigenbindungsstellen und interagieren mit dem MHC-Molekül, während die Aufgabe einer hypervariablen Region die Erkennung des Antigens ist.

Während der Reifung der T-Zellen durchlaufen getrennte, polymorphe und nichtpolymorphe Gensegmente den Prozess der somatischen Rekombination, sodass infolgedessen eine Vielzahl von unterschiedlichen TCR-Ketten resultiert und so die Bildung eines großen Repertoires an möglichen TCR mit ca. 10^{16} Kombinationen ermöglicht. Diese enorme Variabilität der spezifischen T-Zell-Rezeptoren sorgt dafür, dass eine praktisch unbegrenzte Vielfalt von potentiell auftretenden MHC-Antigen-Komplexen (s.u.) erkannt werden kann (Janeway, Chervonsky et al. 1997).

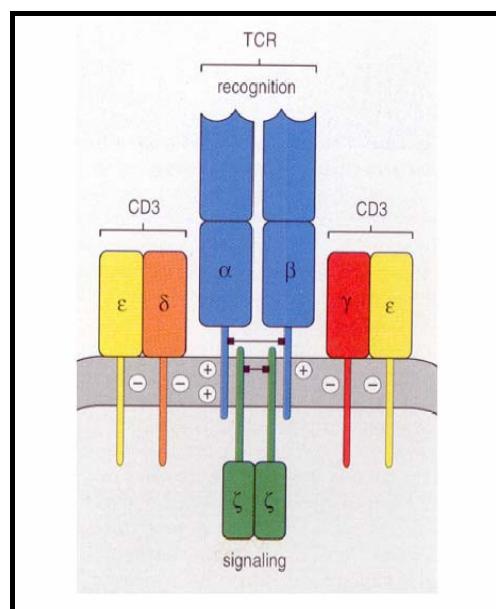


Abb. 10: Aufbau des T-Zell-Rezeptors (Janeway, Chervonsky et al. 1997).

6.3.2. B-Zellen

B-Lymphozyten repräsentieren im Gegensatz zu den T-Lymphozyten einen weitaus geringeren Teil der zirkulierenden lymphatischen Zellen. Ihre Bezeichnung verweist auf ihren ursprünglichen Bildungsort, der Bursa Fabricii bei den Vögeln (Zentel, Nohr et al. 1991). Da den Säugetieren dieses lympho-epitheliale Organ jedoch fehlt, wirken das Knochenmark, lymphatisches Gewebe des Darms und Langerhans-Zellen der Haut als Äquivalente. Die dort immunologisch gereiften B-Zellen treten dann wieder in den Kreislauf über, wo sie in lymphatischen Organen wie beispielsweise Lymphknoten oder Milz verweilen. Wenn B-Lymphozyten aktiviert werden, können sie zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen differenzieren. Im Vergleich zu den T-Zellen, die sich erst nach einer gewissen Zeit in sog. „memory-cells“ umwandeln, erfolgt die Bildung von Gedächtniszellen in der B-Zellreihe sofort. Die Affinitätsreifung der B-Zellen verbessert durch somatische Mutation in den Ig-Genen die Bindungsaffinität der gebildeten Antikörper bis auf ein Tausendfaches (somatische Hypermutation) durch leichte Abweichungen in der Klonalität der proliferierenden Zelle. Dies ist bei einem erneuten Antigenangriff oder Antigenkontakt von großem Vorteil, da dann die Zweitantwort besser und schneller eingreift und das Antigen schneller und wirksamer bindet. Daher ist die benötigte Ag-Konzentration bei einer Sekundär-Antwort niedriger als bei der Primären.

Parallel zu Entwicklung von Gedächtniszellen differenzieren sich B-Lymphozyten durch Stimuli wie Zytokine, CD-40-Liganden oder Antigen-Kontakt (Tan, Gudgeon et al. 1999; Ha, Tsuji et al. 2006; Lee, Sinkovits et al. 2006; Fagone, Sriburi et al. 2007) in Plasmazellen (Kohler 2006). In der Folge dieser Zelldifferenzierung werden große Mengen an Antikörpern produziert, die eine wichtige Rolle in der frühen Immunantwort auf Viren oder Bakterien spielen (Kearney 2005), noch bevor das erworbene Immunsystem aktiv wird. B-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche als Oberflächenmarker eine Reihe von Eiweißen, die funktionell wichtig sind und zu ihrer Identifizierung z.B. im menschlichen Blut oder in Gewebeproben verwendet werden können. Dazu zählen membranständige Immunglobuline (IgM, IgD), sowie die Oberflächenmarker CD19, CD20 und CD21 (Vugmeyster, Howell et al. 2004; Bae, Martinson et al. 2005). Beim Kontakt eines Antigens mit einem dieser Oberflächenmarker reagieren B-Zellen mit Proliferation und Differenzierung, sowie Präsentation für T-Helferzellen. Die Präsentation entstehender Peptide auf der Zelloberfläche erfolgt über eine nicht-kovalente Bindung an MHC-Moleküle. Diese

Peptid-MHC-Molekül-Komplexe werden dann von antigenspezifischen MHC-restringierten T-Helferzellen erkannt, die daraufhin Zytokine ausschütten. Nur durch die B-Zell-gebundene Antigenpräsentation kann einer T-Zelle das Signal für eine signifikante Interleukinproduktion vermittelt werden (Macaulay, DeKruyff et al. 1997).

6.3.3. Natürliche Killer Zellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zählen ebenfalls zur Gruppe der Lymphozyten, wenn auch sie mit 5- 10% einen kleineren Teil als die B- oder T-Lymphozyten im Bezug auf die gesamten peripheren Blutzellen ausmachen (Fassett, Davis et al. 2001). Sie entstehen aus den gleichen Vorläuferzellen wie die T-Zellen im Knochenmark, werden aber nicht im Thymus weiterentwickelt, sondern befinden sie sich hauptsächlich im Blut und in sekundären Lymphorganen wie z.B. der Milz.

Natürliche Killerzellen sind durch ihre Zytotoxizität gegen Tumorzellen und andere virusinfizierte Zellen, v.a. gegen Herpesviren charakterisiert. Nicht minder bedeutsam ist ihre Funktion als Zytokin- und Chemokin-Produktoren (Biron, Nguyen et al. 1999; Ying, Meng et al. 2001; McKenna, Sumstad et al. 2007; Tabatabaei-Zavareh, Vlasova et al. 2007). Im Gegensatz zu den B- und T-Zellen exprimieren NK-Zellen keine Antigen-spezifischen Rezeptoren, sondern unterschiedliche Kombinationen von inhibitorischen und stimulierenden Rezeptoren, womit eine große Zahl verschiedenster Zielzellen erkannt werden können. Negative Signale werden über NK-Inhibitor Rezeptoren (KIR) zwischen NK- und Zielzelle vermittelt (Fassett, Davis et al. 2001). NK-Zellen funktionieren als Produktionsstätten für inhibitorische Rezeptoren gegen MHC 1-Moleküle, woraufhin der Vorgang der Rezeptoraktivierung gestoppt wird (Yokoyama 2005). Im Gegensatz zu tumor- oder virusinfizierten Zellen exprimieren gesunde Zellen normale Level an MHC 1-Molekülen und sind so in der Lage dem ‚Angriff‘ der natürlichen Killerzellen zu widerstehen. Dafür setzen sie ihre MHC 1-Moleküle als Liganden ein, um eine Vielzahl an inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zellen zu besetzen und somit deren Zytotoxizität zu blockieren (Long 1999; Fassett, Davis et al. 2001).

Die NK-vermittelte Lyse von Tumor- und anderen infizierten Zellen beinhaltet verschiedene Rezeptoren, welche primär auf Zellen mit erhöhter Aktivität, Proliferation und Transformation, wie beispielsweise den Tumorzellen exprimiert werden (Moretta and Moretta 2004).

6.3.4. Mononukleäres phagozytierendes System

Mit der Bezeichnung ‚Mononukleäres phagozytierendes System‘ werden alle Makrophagen, Monozytenvorläuferzellen und reifen Monozyten zusammengefasst, die gemeinsame Eigenschaften wie Phagozytose oder parakrine Sekretion besitzen und von der gleichen Zelllinie abstammen. Ihre Funktion besteht in der Entfernung fremder Substanzen und dem Anstoß des Immunsystems. Allgemein werden Makrophagen als die ‚Wächter‘ des Immunsystems bezeichnet, die auf einen Reiz wie z.B. Infektion zirkulierende Monozyten aus dem peripheren Blut zum entsprechenden infizierten Gewebe wandern lassen um dort in Gewebe-Makrophagen zu differenzieren (Sharif, Bolshakov et al. 2007). Sie sind in nahezu allen Organen des Körpers verteilt und differenzieren sich aus pluripotenten Knochenmarkszellen (Brade 1980). Die Hauptaufgabe aktiverter Makrophagen besteht in der Phagozytose von Fremdkörpern. Diese werden zunächst mittels Endozytose in ein Phagosom eingehüllt. Durch das Fusionieren von Phagosom und Lysosomen werden toxische Produkte freigesetzt, die die meisten Bakterien töten und in Fragmente zerlegen. In einer Studie von Huynh wird der genaue Mechanismus der Fusion von Lysosomen und Phagosom mittels des LAMP-Proteins beschrieben. Für die intrazelluläre Abtötung von Mikroorganismen sind die in Lysosomen enthaltenen Säurehydrolasen und Peroxidasen sehr wichtig (Davies and Allison 1976; Huynh, Eskelinen et al. 2007). Die Abbauprodukte der getöteten Bakterien werden dann über Exozytose freigesetzt (Yamamoto 2006).

Bei einer Überreaktion des mononukleären, phagozytierenden Systems kann es zur Auslösung eines septischen Schocks, Multiorganversagen oder dem ARDS kommen (Van Amersfoort, Van Berkel et al. 2003). Monozyten/ Makrophagen produzieren Komplementkomponenten und Proteininasen, Prostaglandine und Interferone (Brade 1980; Rediske and Pickering 1985), welche unter verschiedenen Bedingungen freigesetzt werden. Prostaglandine werden hauptsächlich von ansässigen Makrophagen freigesetzt, die somit auf einen inflammatorischen Reiz reagieren. Die Proteinaseproduktion dagegen erfolgt kontinuierlich (Davies, Bonney et al. 1980). Mit der Freisetzung des Komplementfaktors C3 werden weitere aktive C3-Fragmente (C3a, C3b, C3e) biologisch aktiviert, die sowohl die Entzündungsreaktion als auch die zytotoxische Reaktion über phagozytäre Prozesse modulieren (Brade 1980).

6.3.5. Granulozyten

Zusammen mit Antikörpern und dem Komplement spielen Granulozyten eine wesentliche Rolle in der Protektion des Körpers gegen Mikroorganismen, besonders im Rahmen der initialen Abwehr (Page and Good 1958) und stellen etwa 60-70% aller Blutleukozyten dar. Als Charakteristikum für Zellen, die durch atopische und allergische Entzündungen aktiviert werden, tragen alle Granulozyten einen Chemokin-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche, an den Proteine binden können (Ying, Meng et al. 2001). Ihre Verfügbarkeit im Falle einer Infektion ist sehr wichtig für eine wirkungsvolle und schnelle Immunantwort, womit klar wird, warum eine ausreichende Menge als Reserve im Körper vorliegt (Lumsden, Valli et al. 1974). Granulozyten werden im Knochenmark gebildet und danach ins Blut abgegeben (Sacchetti, Ponassi et al. 1971). Sie können aber auch die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern und sind somit auch extravaskulär zu finden. Ihr Abbau erfolgt im mononukleären Phagozytosesystem nach zwei bis drei Tagen, was ihrer durchschnittlichen Überlebensdauer entspricht. Reife Formen enthalten gewöhnlich einen gelappten Kern und viele Granula, die man aufgrund des Färbeverhaltens ihres Protoplasmas und ihrer etwas verschiedenen Eigenschaften in Neutrophile, Eosinophile und Basophile Granulozyten unterteilt. Reize wie der ‚Granulozyt-Colony stimulierender Faktor‘ (G-CSF) oder ‚Granulozyten-Makrophagen Colony stimulierender Faktor‘ (GM-CSF) sind endogene Zytokine, die die Granulozytopoese stimulieren und regulieren (Fernandez-Varon and Villamayor 2006). Die Funktion der Granulozyten liegt vor allem in der unspezifischen Abwehr von Bakterien, Parasiten und Pilzen durch Phagozytose. Unter immunsuppressiven Bedingungen, z.B. unter Tumorchemotherapie ist die Zahl der Granulozyten deutlich erniedrigt und meist mit einer Neutropenie assoziiert. In dieser Phase zeigt sich ein hohes Potential für Morbidität und Mortalität der Patienten, da das körpereigene Immunsystem nicht vollständig funktionsfähig ist. Studien beschäftigen sich mit dem Klonen von CSF-Genen und der biopharmazeutischen Produktion hämopoetischer Vorläuferzellen von Granulozyten, die die immunsuppressive Therapie verbessern sollen (Fernandez-Varon and Villamayor 2006).

B. FRAGESTELLUNG

In dieser Studie wollten wir die Auswirkung von bcl-2, welches über einen adenoviralen Gentransfer in Hepatozyten eingeschleust wurde, auf den Ischämie- und Reperfusions schaden nach Lebertransplantation im Rattenmodell untersuchen. Besonderes Interesse galt dabei der Frage, inwieweit damit eine Minderung des Organschadens nach Transplantation erreicht werden kann und ob ein adenoviraler Gentransfer die Effizienz einer erfolgreichen Transplantation steigern kann.

Eine entscheidende Ursache für die Organschädigung stellt die Apoptose im Rahmen der Minderperfusion nach Transplantation dar. So haben wir uns die Aufgabe gestellt, diese apoptotischen Prozesse mittels antiapoptotischer Proteine zu minimieren. Wir stellten die Hypothese auf, dass durch einen adenoviral gesteuerten bcl-2-Transfer Apoptose im transplantierten Gewebe deutlich minimiert werden kann und so mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit zu rechnen ist.

C. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien und Geräte

Chemikalien	Agarosegel	Peqlap Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany
	Aprotinin	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	Atropin	Braun, Melsungen AG, Germany
	Cäsiumchlorid	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany
	Dexamethason	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	D-Glukose	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	Doxycycline	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	ETH-Bromid	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	Formalin	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	Heparin	Braun, Melsungen AG, Germany
	Lipofectamine	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	Kochsalz	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	Natriumnitrit	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	Paraffin	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	Penicillin G	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	SDS Dodecysulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	Wasserstoffperoxid	Hausapotheke
	Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	Zitronenmonohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Puffer/ Lösungen	Alkohol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	DAB Chromogen-Substratlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	destilliertes Wasser	Millipore Anlage
	DNase-I	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	Elektrophoresegel	BioRad Laboratories GmbH, München, Germany
	Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	HBSS	Gibco Invitrogen Corporation, Langley, OK, USA
	Kollagenase	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	TRIzol-Reagenz	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	UW-Lösung	DuPont Pharma GmbH Bad Homburg, Germany
	FCS 10%	Biochrom AG, Berlin, Germany
	Goat-Serum (1%, 20%)	SIGMA-Aldrich® Chemie GmbH, München, Germany
	TAE-Puffer (1x)	selbst angesetzt

Antikörper	Anti- Aktin (C-11) polyklonal → Sek-AK: donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
	Anti- CD4 monoklonal → Sekundär AK (goat anti-rabbit anti-mouse) aus Duett-Kit	W3/25, Klon:# ab6413, Abcam, Cambridge, England DAKO Deutschland GmbH Hamburg, Germany
	Anti- CD8 polyklonal → Sekundär AK (goat anti-rabbit anti-mouse) aus Duett-Kit	Klon: #ab4055, Abcam, Cambridge, England DAKO Deutschland GmbH Hamburg, Germany
	Anti- CD45RA monoklonal → Sekundär AK (goat anti-rabbit anti-mouse) aus Duett-Kit	Klon 4KB5, # ab755, Abcam, Cambridge, England DAKO Deutschland GmbH Hamburg, Germany
	Anti- Bcl-2 (100) monoklonal → Sekundär AK: goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Vektoren/ Plasmide	BamH I	Biolabs, New England, MA, 20 U/ml
	Pac I	Biolabs, New England, MA, USA, 10.000 U/ml
	Spe I	Biolabs, New England, MA, USA, 10.000 U/ml
	pAd Easy-1	Vogelstein (He, Zhou et al. 1998)
	pAdTrack	Vogelstein (He, Zhou et al. 1998)
	pAd rt-TA - CMV	von Dr. Akusjarvi zur Verfügung gestellt
	pTRE-2	CLONTECH, Hercules, CA, USA, PR651807
Primer	TetOn-Promotor	CLONTECH, Hercules, CA, USA
	CD4	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany
	CD8	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany
	CD163	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany
	MPO	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany
	TNF α	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany
	Ig β	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany
	GAPDH	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany
	Oligo-dT Primer	Roche Diagnostics, Penzberg, Germany
Kits	BC Asssay Protein Kit	Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
	Quantitation Kit	Uptima, Interchim, Montlucom, France
	Duett Kit	DAKO Deutschland GmbH Hamburg, Germany
	Fast Start cDNA SYBR Green Kit	Roche, Penzberg, Germany
	First Strand cDNA- Synthese Kit	Roche, Penzberg, Germany
	In Situ Cell Death Detection Kit	POD Boehringer, Mannheim, Germany

Versuchs-Tiere	Lewis-Ratten 180-220g	Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Germany
Zelllinien	293 TetOn Zellen BJ5183 elektrokompetente <i>E.coli</i>	CLONTECH, Hercules, CA, USA Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Geräte	pAdEasy-System horizontale Elektrophoresekammer vertikale Elektrophoresekammer Elektropurator Gene Pulser Lichtmikroskop Lichtmikroskop Light Cycler PCR Mikrowelle Mikroskop. Camera Schüttler Stereomikroskop Ultrazentrifuge Wärmeplatte Western-/Tank- Blot Elektrophorese	nach Bert Vogelstein (He, Zhou et al. 1998) BioRad Laboratories GmbH, München, Germany BioRad Laboratories GmbH, München, Germany BioRad Laboratories GmbH, München, Germany BioRad Laboratories GmbH, München, Germany Leica, Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Germany Leica DMLB, U-MDO10B Olympus Optical CO, LTD Roche Diagnostics, Penzberg, Germany Panasonic, NN-SD456W RT Color Diagnostic Instrument, Puchheim, Germany Leica, Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Germany Leica M651, Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Germany Eickemeyer-Medizintechnik KG, Tuttlingen, Germany MikroM, Thermo Scientific, Walldorf, Germany BioRad Laboratories GmbH, München, Germany

Abb. 11: Materialien und Gerät

2. Ratten LTX-Modell

Alle Versuche wurden unter Beachtung der Tierschutzbedingungen beantragt und genehmigt und innerhalb der Einrichtungen der chirurgischen Fakultät der Universität Regensburg durchgeführt (grant AZ 621-2531,1-4/98). Wie in der Tabelle (Abb. 12) aufgeführt, wurden die insgesamt 110 Versuchstiere in acht Gruppen je nach adenoviraler Infektion, bcl-2-Transfer und Doxycyclin-Gabe eingeteilt. Dabei wurden jedem Versuch zwischen 2 und 20 genidentische männliche Lewis-Ratten zugeteilt, die mit Ohrmarken nummeriert waren, wobei nicht alle Versuchstiere beispielsweise wegen Erkrankung oder Versterben in der Auswertung berücksichtigt wurden.

Als Kontrollgruppen wurden neben unbehandelten Tieren (Versuch 1) zwei Gruppen mitgeführt (Versuch 4 und Versuch 6), die mit einem sog. leeren Adenovirus infiziert wurden. Dabei erfolgte die Infektion nach dem gleichen Schema nach Vogelstein (He, Zhou et al. 1998) wie in den Versuchen 3 und 5, jedoch ohne bcl-2 im pAd Track-Plasmid, um zu beweisen, dass der Adenovirus keine schädlichen Wirkungen an sich bzw. Einflüsse auf die bcl-2 Expression hat.

In unserem verwendeten TetOn-System wurde die Transgenexpression durch die Ko-Infektion mit einem reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (rt-TA) induziert und somit eine regulierbare Expression von bcl-2 erreicht. Für die Bindung des rt-TA an TRE (s.u.) war dabei die Zugabe von Doxycyclin notwendig um die Transkription des Promotors in Gang zu setzen. Die Ko-Infektion der Tiere erfolgte über die Vena jugularis. Anschließend wurde den Tieren Trinkwasser zur Verfügung gestellt, das mit Doxycyclin versehen war. Nach 24h erfolgte die Explantation der Leber und nach weiteren 16h kalter Ischämie die Implantation des Organs in die gesunde Ratte. Je nach Versuchsgruppe wurden dann 24h (Versuch 5 und 6) bzw. 7d (Versuch 3 und 4) später die Organe zur Auswertung entnommen. Zur Beurteilung der Immunreaktion nach Transplantation wurden bei diesen adenoviral behandelten Lebern jegliche Störfaktoren vermieden.

Eine Lebertransplantation im Rattenmodell stellt ein physiologisches Modell dar, das der klinischen Durchführung einer Lebertransplantation bezüglich Transplantatabstoßung, warmer und kalter Aufbewahrung ebenso wie der Art der Revaskularisation sehr nahe kommt. Experimente mit größeren chirurgischen Komplikationen (wie schwere Blutungen, Gallengangsstenose, Peritonitis) wurden dabei von jeglichen Analysen ausgeschlossen. So weisen 100% der Versuchstiere

eine unbegrenzte Überlebensrate in allen beschriebenen Experimenten auf, für den Fall, dass die Organe für kurze Perioden gut erhalten waren.

Versuchs-tiere	Tier-Nr.	Versuch
Versuch 1	0	unbehandelt
Versuch 2	Tier 1 Tier 2	12 13 } Doxycyclin, transplantiert
Versuch 3	Tier 1 Tier 3 Tier 5 Tier 6 Tier 8	14 18 22 26 28 } Bcl-2-Virus, rt-TA-Ko-Infektion, Doxycyclin, nach 7d Organentnahme
Versuch 4	Tier 1 Tier 4 Tier 6 Tier 7	32 37 42 47 } leerer Adenovirus Typ5, rt-TA-Ko-Infektion, Doxycyclin, nach 7d Organentnahme
Versuch 5	Tier 1 Tier 2 Tier 3 Tier 4	52 57 63 67 } Bcl-2-Virus, rt-TA-Ko-Infektion, Doxycyclin, nach 24h Organentnahme
Versuch 6	Tier 1 Tier 2 Tier 3	68 72 89 } leerer Adenovirus Typ5, rt-TA-Ko-Infektion, Doxycyclin, nach 24h Organentnahme
Versuch 7	Tier 1	93 Bcl-2-Virus, rt-TA-Ko-Infektion, Doxycyclin, nach 7d Organentnahme, nicht transplantiert
Versuch 8	Tier 4	104 Doxycyclin, transplantiert

Abb. 12: Ratten-LTX-Modell

2.1. Ablauf der LTX

Für die Versuche wurden gezüchtete, männliche Lewis-Ratten mit einem Gewicht zwischen 180g und 220g (Charles River, Wiga, Sulzfeld, Germany) verwendet. Der Gebrauch eines genidentischen Modells erlaubt die Analyse der Immunantwort auf Ischämie- und Reperfusionschaden sowie einer adenoviralen Gentherapie, die vom Transplantat-Abstoßungs-Mechanismus unabhängig ist. Die orthotope Lebertransplantation wurde nach einer Prämedikation mit Atropin (0,1mg/kg) in einer

Ätheranästhesie durchgeführt (Kamada and Calne 1983). Die kalte Ischämiezeit betrug 16 Stunden bei 4° C in einer UW-Lösung, die Dexamethason (16mg/l) und Penicillin G (200,000 U/l) enthielt, so wie es für Lebertransplantation bei Ratten empfohlen wird. Die Rearterialisierung der Transplantate wurde durch Einbringen eines intraluminalen Stents erreicht (Sumimoto, Jamieson et al. 1989). So konnte nach einer maximal 15 Minuten andauernden Portalvenenabklemmung der Blutfluss wieder hergestellt werden. Der Gallenweg wurde durch eine Splint Technik rekonstruiert. Während des ganzen chirurgischen Eingriffs wurden die Versuchstiere auf eine gewärmede Operationsmatte mit geregelter Temperatur um 36.5° C gelegt. Im Anschluss an die Operation wurden die Tiere in einer warmen Umgebung gehalten und hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Sumimoto, Jamieson et al. 1989) war ein Überleben sieben Tage nach Transplantation als eindeutig erwiesen. Gewebeproben für histologische Untersuchungen, TUNEL-Färbungen und RT-PCR-Analysen wurden von überlebenden Versuchstieren sieben Tage nach dem Eingriff entnommen.

Mit dem Ziel sehr früh die Funktionalität und Dynamik des Transplantats im Hinblick auf Apoptosevorgänge beurteilen zu können, wurden im Rahmen der gleichen Versuchsbedingungen wie im vorangegangenen Experiment zusätzliche Versuche mit weiteren Laborratten durchgeführt. So wurden auch in diesen Fällen entsprechend den 7-Tage-Experimenten nach 90 Minuten (TUNEL) und 24 Stunden (TUNEL, RT-PCR) Gewebeproben in tiefer Ätheranästhesie entnommen. Der letzte Zeitpunkt der Probenentnahme wurde durch die Versuchstiere des 7-Tage-Experiments festgelegt. Überwiegend wurden apoptotische Veränderungen in den Transplantaten 24 Stunden nach der Reperfusion erwartet. Diese Unterscheidung in verschiedene Experimentgruppen erlaubt eine interferenzfreie Beobachtung der Überlebensrate in einem Zeitraum von sieben Tagen.

2.2. Experimentelle Gruppen

Gruppe eins wurde als Kontrollgruppe mitgeführt. Hier erfolgte weder eine Virusinfektion noch eine Transplantation der Leber.

Den Tieren der zweiten Versuchsgruppe wurde ausschließlich Doxycyclin über das Trinkwasser gegeben. Es erfolgte keine Transplantation.

In der Gruppe drei wurden die Spenderratten mit dem rt-TA Ad5 und Ad5-bcl-2 koinfiziert und Doxycyclin über das Trinkwasser gegeben. Das Organ wurde nach 48 Stunden transplantiert und nach sieben Tagen explantiert.

In Gruppe vier wurde den Spendertieren 48 Stunden vor der Transplantation der Kontroll-Ad5 und rt-TA Ad5 injiziert. Direkt im Anschluss wurde Doxycyclin über das Trinkwasser verabreicht. Dann wurde die infizierte Spenderleber in den Empfängerorganismus (=Ratte) transplantiert. Die Explantation der Leber erfolgt wiederum nach sieben Tagen.

Ähnlich der Versuchsgruppe drei wurden die Tiere der Gruppe fünf ebenfalls mit bcl-2-Ad5 und rt-TA Ad5 koinfiziert und mit Doxycyclin behandelt. Die Explantation erfolgte aber im Vergleich zu den anderen Gruppen schon 24 Stunden nach der Ko-Infektion.

Den leeren Adenovirus Typ5 sowie Doxycyclin erhielten die Tiere der Gruppe sechs. Die Organentnahme erfolgte nach 24 Stunden.

Den Versuchsratten der Gruppe sieben wurden gleiche Bedingungen wie der Gruppe vier geboten. Doch es erfolgte keine Transplantation.

Im achten Versuch wurden die Tiere nur mit Doxycyclin behandelt, ohne Virusgabe. Im Unterschied zur Gruppe zwei erfolgte hier im Anschluss die Transplantation.

In vorausgegangenen Versuchen wurde die Bedeutung des bcl-2 Ad5 in Bezug auf die Apoptose untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Ratten von Gruppe drei und fünf eine deutlich geringere Apoptoserate aufzeigten. Somit konnte gezeigt werden, dass nach Transplantation einer mit bcl-2 Ad5/ rt-TA Ad5 koinfizierten Spenderleber das fremde Organ vor einem überschießenden Zelltod geschützt wurde (Puellmann, Beham et al. 2006). In weiteren Versuchsreihen wurden die Tiere (Lebern) mittels qPCR und Western-Blot ausgewertet. Weiterhin wurden Cryoschnitte dieser angefertigt auf ihre immunhistochemische Reaktion nach Transplantation und der damit verbundenen Immunantwort untersucht. Ziel unserer Versuchsreihe war folglich herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der Wirkung des bcl-2 Ad5 auf die Apoptose der Leberzellen und deren Immunantwort nach der Infektion besteht.

3. Doxycyclin-induziertes Promotor System

Die Forschungsgruppe um Bujard und Gossen entwickelte 1992 ein Tetrazyclin-abhängiges System (Tet-System), durch welches eine kontrollierte Genexpression sowohl *ex vivo* in Zellkulturen, als auch *in vivo* in transgenen Mäusen möglich wurde (Gossen and Bujard 1992; Furth, St Onge et al. 1994). In einem ersten Schritt bindet rt-TA, ein Fusions-Aktivator aus einem Transkriptionsfaktor und dem Tet-Repressor-Gen, das aus *E.coli* Zellen isoliert wird, an TRE, ein Tetracyclin-responsives Promotorelement (s.u.) des adenoviralen Plasmid-Konstrukts. Die Aktivierung der Transkription in dem von uns verwendeten TetOn-System erfolgt in einem zweiten Schritt durch Zugabe des exogenen Liganden Tet, bzw. seinem Derivat Doxycyclin (Miller and Rosman 1989) (New RevTet Vectors, January 1999, CLONTECHniques XIV(1):22–23.). Daraufhin wird die Expression initiiert und es erfolgt die Expression des Zielgens. Dabei kann nicht nur der zeitliche Ablauf der Genexpression kontrolliert werden, sondern auch mit der Menge von Doxycyclin das Expressionslevel reguliert werden (siehe Abb.: 13) (Puttini, Beggah et al. 2001).

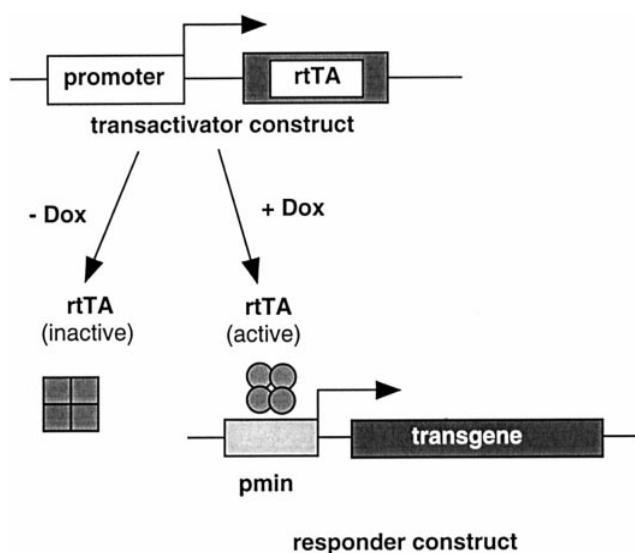


Abb.13 : Tetracyclin-abhängiges System (Tet-System)

Das Tet-System ermöglicht eine regulierbare Expression des gewünschten Gens mit Hilfe des Transaktivator-Konstruktes rt-TA und einem Transkriptionsfaktor. Dieser bindet an die TATA-Box in der CMV-Promotorregion und ist verantwortlich für die Genregulierung der Transkription. Die Interaktion von rt-TA mit der Tet-Sequenz ist im TetOn-System nur in Anwesenheit von Doxycyclin möglich (Puttini, Beggah et al. 2001).

4. Apoptose-Nachweismethoden

Eine apoptotische Zelle weist typische morphologische Veränderungen auf, die man durch verschiedenste Methoden nachweisen kann. Es zeigt sich das charakteristische Bild einer geschrumpften Zelle, Einschnürungen der Zellmembran (‘blebbing’) und membranumhüllte Vesikel, sog. apoptotische Restkörper (Kiess and Gallaher 1998). Durch den Verlust der Zellstruktur wird das Phosphatidylserin (PS), das normalerweise auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, nach außen gekehrt und durch das Andocken des Proteins Annexin-V nachweisbar (Garwicz, Palmblad et al. 2006; Saijo, Nagata et al. 2006; Munoz, Franz et al. 2007). Auch natürliches IgM kann apoptotische Zellen erkennen. Isolierte IgM-Moleküle binden dabei an apoptotische Thymozyten, was durch Durchflusszytometrie nachgewiesen werden kann (Fu, Fan et al. 2006). Als klassische Analyse von fragmentierter DNA gilt der Nachweis mittels TUNEL-Assay nach Gavrieli (TUNEL= terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUT nickend labeling) (Gavrieli, Sherman et al. 1992). Dabei werden die im Verlauf des apoptotischen Zellabbaus entstandenen DNA-Fragmente mit Hilfe einer terminalen Desoxynukleotidyl Transferase (TdT) markiert. TdT ist ein Enzym, das die Bindung der Tetramethylrhodamine red (TMR) gekoppelten Nukleotide an die 3' OH-Enden der Fragmente katalysiert. Die fluoreszierenden, Apoptose-positiv markierten DAB-Zellkerne können ausgezählt und so die absolute Zahl TUNEL-positiver Zellen in Sinusiod- bzw. Endothelzellen und Hepatozyten ermittelt werden.

5. Herstellung rekombinanter Adenoviren

Rekombinante Adenoviren stellen ein sehr vielseitiges System für Genexpressionen und therapeutische Zwecke dar. Damit ist ein Gentransfer in verschiedenste Zellen *in vitro*, aber auch eine Beimpfung *in vivo* unabhängig von der aktiven Zellteilung möglich. In dieser Studie wurden diese Eigenschaften für die Einschleusung und Exprimierung von bcl-2 in Adenoviren genutzt.

Die adenoviralen Vektoren für die Genexpression wurden mit dem AdEasy-System nach B. Vogelstein hergestellt (He, Zhou et al. 1998). Dieses System hat gegenüber anderen bekannten Systemen erhebliche Vorteile. Diese ergeben sich z.B. durch die Möglichkeit sich-teilende bzw. ruhende Zellen infizieren zu können und dabei hohe Virustiter (bis 10^{11} – 10^{12} FFU/ml) zu erzielen. Bei einem solchen hocheffizienten

Gentransfer können Transgen-Sequenzen bis zu 10kb eingeschlossen werden (Thomas, Ehrhardt et al. 2003). Die Pathogenität ist dabei sehr gering, da die Virus-DNA zwar in den Zellkern gelangt, dort aber nicht in das Wirtsgenom integriert wird. (Burroughs, Kayda et al. 2004; Kreppel and Kochanek 2004).

Das gewünschte Fremdgen bcl-2, inklusive des TetOn-Promotors und der pTRE-Sequenz werden zunächst in den Transfervektor pAd-Track kloniert. Gleichzeitig kodiert pAdTrack für das grün-floureszierende Protein (= GFP), welches durch einen CMV-Promotor reguliert wird. Weiterhin wird der Vektors pAd-Easy-1 benötigt, welcher in der E1- & E3 - Region deletiert ist. Beide Konstrukte werden über die vorhandenen Rekombinationsstellen in den *E.coli*-Stamm BJ5183 ko-transfiziert. Anschließend folgt die Linearisierung und Transfektion des rekombinaten Plasmides in die 293 tet-on Zellen (humane embryonale Nierenzellen), welche die fehlende E1-Region enthalten. Diese Zellen produzieren Viruspartikel. Über die Expression von GFP (s.o.) kann dann die Virusvermehrung bestätigt und verfolgt werden.

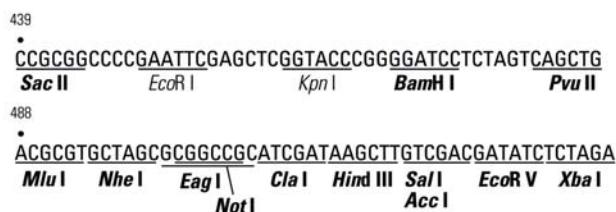
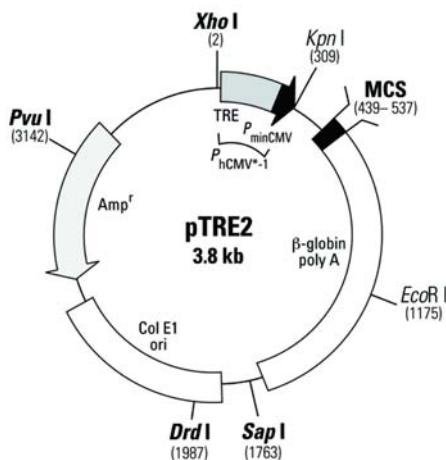


Abb. 14: pTRE2 (Qin, Shen et al. 2002), CLONTECH (May 2006, PR651807)

pTRE2 (p tet response element) ist ein Plasmid, mit dessen Hilfe ein „gene of interest“ im Tetrazyclin-regulierten TetOn™ System exprimiert werden kann (Gossen, Freundlieb et al. 1995). Es enthält MCS (map and multiple cloning site) und einen CMV-Promotor (Resnitzky, Gossen et al. 1994).

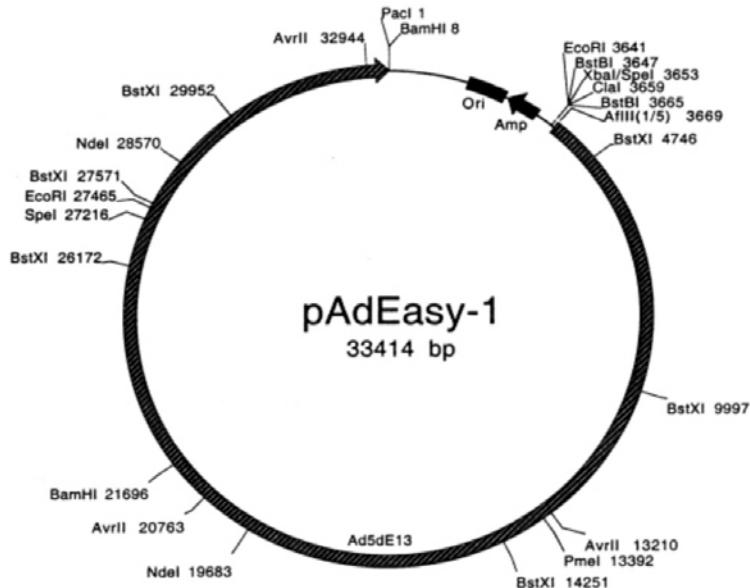


Abb.15: pAdEasy-1 (He, Zhou et al. 1998)

pAdEasy-1 ist ein Backbone-Vektor, der das vollständige Erbgut von Ad5 bis auf die E1- und E3-Region für die Virusreplikation enthält.

Die E3- Region kodiert für Proteine zur Umgehung der Wirtsabwehr und ist daher entbehrlich. Durch das Fehlen der E1-Region ist das Virus replikationsunfähig und somit nicht in der Lage, infektiöse Viruspartikel zu produzieren.

Das klonierte Konstrukt aus bcl-2 und dem Shuttle Vektor wird mittels Restriktionsenzym Pmel linearisiert und zusammen mit dem adenoviralen Vektor pAdEasy-1 in BJ5138 kotransformiert.

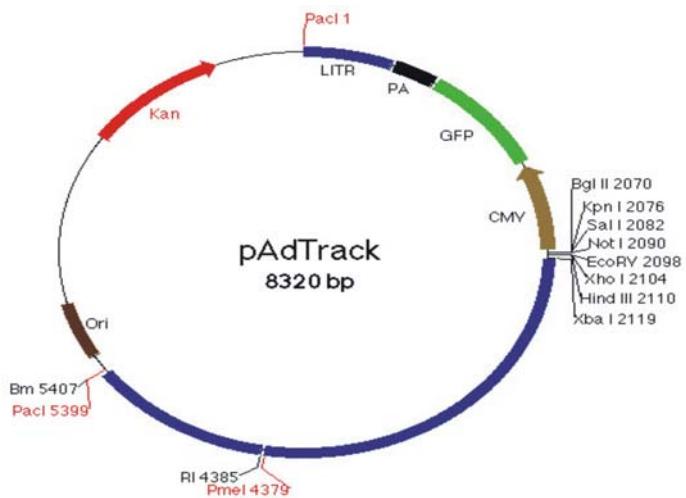


Abb.16: pAdTrack (He, Zhou et al. 1998)

Der pAdTrack-Vektor dient es als Transfervektor für das gewünschte Gen bcl-2 und den voranklonierten TetOn-Promotor. Zusätzlich sind darin die Informationen für das grün fluoreszierende Protein GFP kodiert, durch welches die Infektionsrate ermittelt werden kann.

Nach einer Infektionszeit von 48 Stunden wurde der Titer mittels Auszählung der GFP-positiven Zellen bestimmt. Die Viruspartikel wurden durch dreimalige Einfrier- und Auftauzyklen aus den Zellen isoliert und durch Ultrazentrifugation mittels eines CsCl-Gradienten gereinigt und aufkonzentriert. (Graham and Prevec 1992).

Der rt-TA Adenovirus, welches unter der Beeinflussung eines CMV-Promotors steht, liefert das Transaktivatorkonstrukt (Molin, Shoshan et al. 1998).

Der ‚leere‘ Ad5 ist ein Kontrollvirus, mit dessen Hilfe die Präsenz des Virus bestätigt werden kann, die Toxizität des Ad5 auf die Zellen überprüft und zum anderen gezeigt wird, dass Ad5 an sich keine Auswirkung auf die bcl-2 Expression hat. Mit Hilfe des shuttle-pAdTrack-Vektors, der GFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthält, wurde der Ad5-GFP konstruiert und als ‚leerer‘ Ad5 bzw. Kontroll Ad5 benannt.

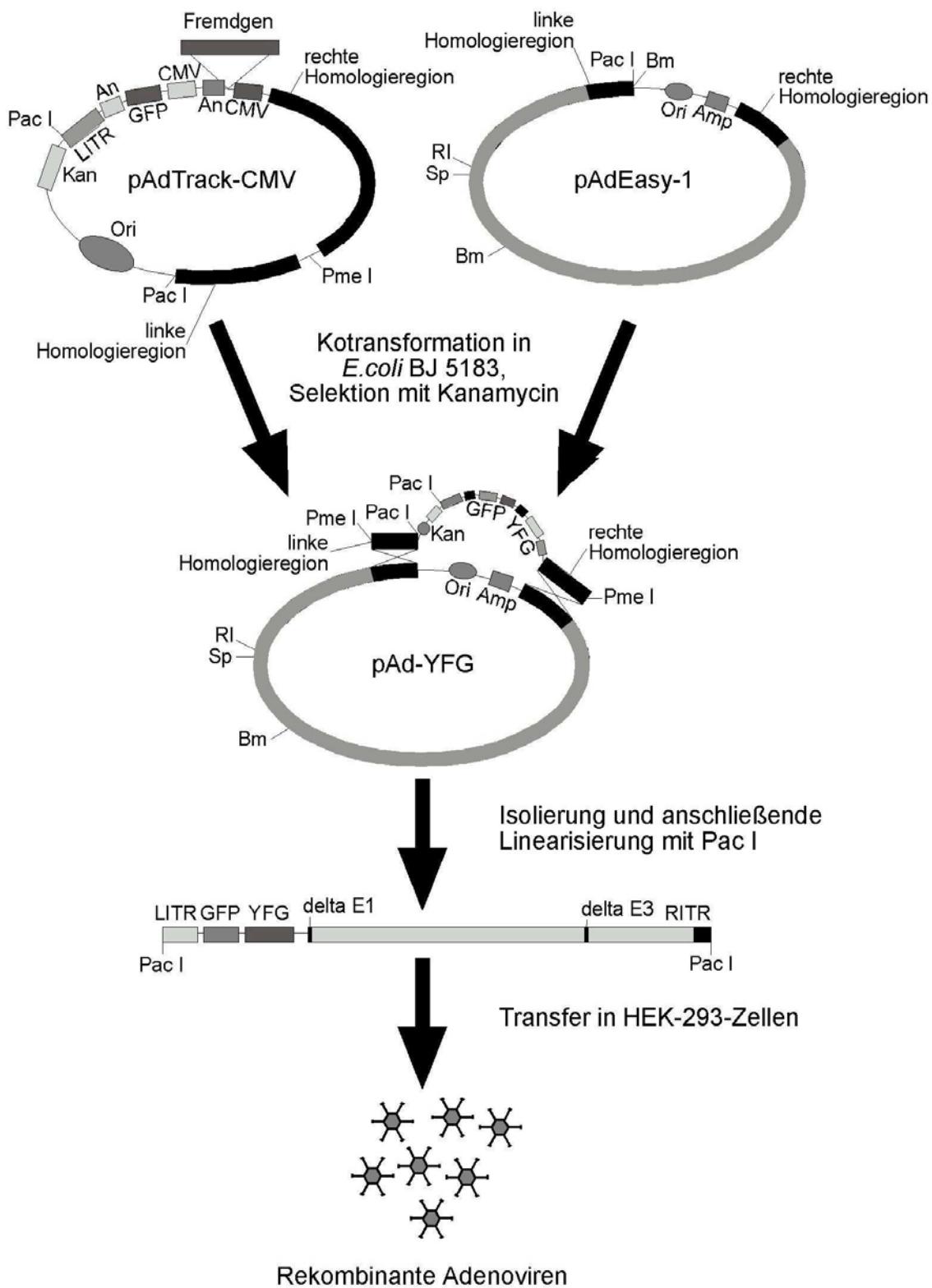


Abb. 17: Schematische Darstellung des AdEasy-Systems nach Vogelstein, modifiziert nach (He, Zhou et al. 1998).

6. Immunhistochemie

Im ersten Teil der immunhistochemischen Laborarbeiten wurden anhand von Thymus- und Milzschnitten optimale Versuchsbedingungen etabliert, wie Verdünnungsverhältnisse und Versuchstemperaturen zur spezifischen Abfärbung von Immunzellen. Gemäß den als optimal getesteten Versuchsbedingungen wurden im Anschluss die Leber-Paraffinschnitte der Versuchstiere nach dem unten aufgeführtem Protokoll gefärbt. Die hierfür verwendeten Antikörper wurden so ausgewählt, dass sie gegen verschiedenen CD-Moleküle gerichtet waren. Diese sind jeweils für eine bestimmte Art und Entwicklungsstufe von T-Zellen spezifisch, die in der folgenden immunhistochemischen Untersuchung detektiert werden sollten. Unter Verwendung der Strept ABC-Methode konnten anti-CD4, anti-CD8 und anti-CD45RA in einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Diese Methode basiert darauf, dass zunächst ein spezifischer Primärantikörper, der gegen die bestimmte Spezies Maus bzw. Kaninchen gerichtet ist, an das im Gewebe zu detektierende Antigen bindet. In einem weiteren Schritt wird ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper zugegeben, der an den Maus- bzw. Kaninchen-Antikörper bindet. Daraufhin wird ein Komplex aus biotinylierter Peroxidase mit Streptavidin, ein Protein mit hoher Affinität zu Biotin aufgetragen. Das Enzym Peroxidase, welches sich in der Komplex-Verbindung mit dem eigentlich nachzuweisenden Antigen befindet, kann dann mit DAB-Lösung sichtbarmach werden. Somit entsteht eine spezifische Farbreaktion, die das gesuchte Antigen im Gewebeschnitt nachweist.

6.1. CD4-Antikörper

In der ersten Versuchsreihe wurde die Färbung der Leberschnitte mit dem CD4-Antikörper durchgeführt (monoklonal, Klon-Nr.: W3/25, Maus-Antikörper, Abcam, Produkt-Nr.: ab6413). Dieses primäre, transmembrane Glykoprotein aus der Maus bindet an die MHC I-Domäne der Immunzellen und ist mit der p56lck Tyrokinase assoziiert.

Eine optimale Färbung der Immunzellen wurde bei einer AK-Verdünnung von 1:100 in Goat-Serum (1%) und einer Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C etabliert.

6.2. CD8-Antikörper

Der CD8-Antikörper (polyklonal, Kaninchen-Antikörper, Abcam, Produkt-Nr.: ab4055) ist ein speziell gegen T-Zellen gerichteter Marker, der als Glycoprotein auf der Oberfläche lokalisierte Zell-Zell-Interaktionen mit dem Immunsystem vermittelt. Dabei geht diese CD8-exprimierende Zelle eine Bindung mit der MHC-II-Domäne der Antigen-präsentierenden Zelle ein.

Im Test verschiedener Antikörperverdünnungen lag die optimale Färbung bei einer Verdünnung des 1%igen Goat-Serums von 1:20 nach Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur.

6.3. CD45RA-Antikörper

Der Memory-Marker CD45, der auf den meisten Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird (Charbonneau, Tonks et al. 1988; Stover and Walsh 1994), spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von T- und B-Lymphozyten. Dabei handelt es sich um ein zellspezifisches Oberflächen-Glycoprotein, das an seiner zytoplasmatischen Domäne eine transmembrane Tyrosinphosphatase-Aktivität besitzt, mit der sie die Lymphozyten aktivieren und zur Proliferation anregen kann (Koretzky, Picus et al. 1990; Koretzky, Picus et al. 1991). Koretzky konnte in seinen Untersuchungen zeigen, dass die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors nur in Anwesenheit von CD45 möglich ist, um eine entsprechende Aktivität der Tyrosinkinase und der Generierung von Phosphatidyl Inositol (PtdIns) –abhängigen second messengern zu erzielen (Koretzky, Picus et al. 1990). Abhängig von Splice- und Glykolysevarianten des CD45 erkennen bestimmte Antikörper nur ein eingeschränktes Spektrum als CD45R, CD45R0, CD45RA, CD45RB oder CD45RC (Yamada, Kaneyuki et al. 1992). Während die niedrig-molekulare R0-Isoform des CD45 bevorzugt auf Gedächtnis-T-Zellen vorkommt, ist die höher molekulare Form CD45RA v.a. auf naiven Zellen zu finden (Michie, McLean et al. 1992) und sowohl auf CD4 als auch in CD8-Zellen exprimiert (Socha, Michalkiewicz et al. 2001).

Bei der Etablierung der Versuchsbedingungen wurden für den CD45RA-Antikörper (monoklonal, Klon-Nr.: 4KB5, Maus-Antikörper, Abcam, Produkt-Nr.: ab755) die besten Versuchsergebnisse bei einer Verdünnung des Goat-Serums von 1:25 und einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C erreicht.

6.4. Versuchsablauf

In den folgenden Versuchen werden mit diesen drei Antikörpern (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA) und mit Hilfe der Strept-ABC-Methode die für diese Arbeit relevanten Antigene in den Leberschnitten aus der Ratte untersucht und nachgewiesen.

Die Gewebeschnitte, die in Formalin fixiert waren, wurden in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (99% → 96% → 70%) entwässert. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Präparate unter Zugabe eines Citratpuffers zur Freilegung der AG-Bindungsstellen für 20 Minuten in der Mikrowelle gekocht. Nachdem der Citratpuffer handwarm abgekült war, wurde kurz mit Aqua dest. gespült und 3 x 5 Minuten mit PBS-Lösung gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Blockierung gegen die endogene Peroxidaseaktivität mit 3%igem Wasserstoffperoxid in reinem Methanol. Wiederum folgten drei Spül- und Waschvorgänge mit destilliertem Wasser und PBS-Lösung für jeweils 5 Minuten. Um Kollagene bzw. unspezifische Proteine zu blockieren wurde 20%iges Goatserum (SIGMA, Produkt Nr.: R133) für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur eingesetzt. Dabei ist es wichtig das entsprechend richtige Blockserum auszuwählen, welches die gleiche Spezies sein sollte, aus der auch der Sekundär-AK stammt.

Die Inkubationszeit und Verdünnung des Primärantikörpers wurde je nach Verwendung von CD4, CD8 oder CD45RA austitriert (s.o.).

Die Primär-Antikörper wurden in 1%igem Goat-Serum (= Endkonzentration) auf die Schnitte gegeben und nach den etablierten Bedingungen inkubiert. Die Bindung von anti-CD4, anti-CD8 und anit-CD45RA wurde durch Zugabe eines Sekundärantikörpers (Ziege anti-Kaninchen und anti–Maus) mit Streptavidin-Biotin-Peroxidase in einem Brückenkomplex (Duett Kit) nachgewiesen (s.o.). Nach erneuten drei Waschvorgängen des Duett Kits mit PBS-Lösung wurden die Schnitte mit Hilfe einer Chromogen-Substratlösung zur Substratreaktion mit Wasserstoffperoxid und Diaminobenzidine Tetrachlorid (Dabareiner, White et al.) überschichtet und maximal 10 Minuten inkubiert. Durch Spülen der Schnitte mit destilliertem Wasser wurde dieser Vorgang gestoppt. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämalaun für 3 Minuten. Anschließend wurden sie etwa 20 Minuten in lauwarmem Leitungswasser gebläut und mit Aquatex eingedeckelt. Daraufhin konnten unter dem Lichtmikroskop braun gefärbte Zellkerne als Äquivalente für anit-CD4, anti-CD8 bzw. anti-CD45RA tragende Immunzellen in den Schnitten identifiziert werden.

7. PCR

7.1. Vorbereitung der Gewebeproben für die quantitative PCR

Die Gewebeproben wurden in ‚TRIzol Reagenz‘ (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) homogenisiert, die totale RNA gemäß dem Protokoll extrahiert und in die RT-PCR eingesetzt. Mit einem First-Strand cDNA-Synthesis-Kit wurde unter Verwendung eines oligo-dT Primers (Roche Diagnostik, Penzberg, Germany) die Reverse Transkription durchgeführt, um die c-DNA zu gewinnen. Um eine genomische DNA-Kontamination zu vermeiden wurden die Proben mit DNase-1 behandelt.

7.2. Quantitative real-time PCR

Zur Erfassung der messenger RNA (mRNA) von dominanten Immunzellen erfolgte eine quantitative qRT-PCR. Anhand von Marker-Molekülen (CD4 und CD8) konnte somit die Präsenz von T-Lymphozyten innerhalb des Transplantats quantifiziert werden. Analog dazu galt Igβ als Nachweis für das Vorhandensein von B-Lymphozyten, sowie CD163 repräsentativ für Makrophagen.

Die PCR-Primer wurden von der korrespondierenden cDNA-Sequenz der Gene-Bank (NM_012705, NM_031538, NM_133533, XM_232342, NM_201270, NM_138880, NM_017008) bestimmt. Die PCR wurde am ‚Light Cycler‘ mit einem ‚Fast Start cDNA SYBR Green Kit‘ (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) durchgeführt und zu Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Eingesetzt wurden Proben, die 0,5 µM Primer und 2µl cDNA enthielten. Dabei wurden sowohl die Temperatur als auch die Magnesiumchloridkonzentration für jeden einzelnen Primer optimiert. Um die Spezifität der Amplifikation der PCR zu bestätigen, wurden die Produkte jedes Primer-Paars sequenziert. So konnte eine möglicherweise unspezifische Amplifikation durch Agarose Gel-Elektrophorese während der Auswertung der Proben ausgeschlossen werden.

	PRIMER	SEQUENZ	5' → 3'
CD4	fw	gAgCACATCCATCACggCCTA	
	rev	ggCCTCCTgATTCTCCTgCT	
CD8	fw	gTCgCTgAACCTgCTACTgCT	
	rev	ACTTgCTCAgggTgAggATg	
CD163	fw	gCCACTggTTCTgCCTACTT	
	rev	gTCTgCACAgCCCAgCTgAC	
MPO	fw	CCAgAgCTCACCTCCATgCA	
	rev	TgTCCAaggCggAACATgAAg	
TNFα	fw	gCACggAATgCATgATCCgA	
	rev	TggAACTgATCAgAgggAgC	
Igβ	fw	AgCggAgCTCCATggTgAAgT	
	rev	CAgTTggTCCAACgTgCTgA	
GAPDH	fw	ggCgTCTTCACCACCATggA	
	rev	CCACAgTCTTCTgAgTggCA	

Abb.18: Primersequenzen (TIB MOL BIOL.)

8. Statistiken

Zur Analyse der Überlebensraten der Ratten im Tierversuch verwendeten wir die Kaplan Meier Methode. Die Überlebensraten von nicht behandelten Kontrollgruppen, Ratten mit dem ‚leeren‘ Ad5 sowie nach Behandlung mit bcl-2 Ad5 wurden in einem Zeitraum von maximal sieben Tagen in einer standardisierten Tabelle ausgewertet. Zur statistischen Prüfung der Ergebnisse des TUNEL-Assays, der Immunhistochemie sowie der Western Blot Analysen verwendeten wir die einfaktorielle ‚ANOVA‘-Methode mit einem festgelegten Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$. Werte kleiner 0,05 ($p < 0,05$) wurden als signifikant festgelegt. Alle Berechnungen wurden unter Verwendung von ‚SPSS‘ (statistical package for the social sciences) standardisiert und durchgeführt. Mit der Varianzanalyse wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten von mindestens zwei Proben bestanden. In diesem Fall wurde bei gleichen Stichprobenmengen (balancierte Daten) der Tukey-Test als ‚post hoc‘ Test verwendet, um zu ermitteln, welche Mittelwerte signifikante Unterschiede zueinander aufwiesen.

D. ERGEBNISSE

1. TUNEL- Färbung zur Bewertung der Apoptoserate

Der histologische Nachweis von TUNEL-positiv gefärbtem Lebergewebe zeigte im Vergleich zu den Kontrollgruppen 24 Stunden und 7 Tagen nach Transplantation eine signifikant höhere Zahl TUNEL-positiver Zellen in den Versuchsgruppen, die mit dem ‚leeren‘ Kontroll Ad5 infiziert wurden. Zudem resultierte die Behandlung der Proben mit TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA in einer bezeichnend geringeren Zahl TUNEL-positiver Zellen zu beiden Zeitpunkten (24 Stunden und 7 Tage nach Transplantation). Zusammenfassend weisen diese Daten eine reduzierte Apoptoserate nach bcl-2-Expression auf. Zudem konnte eine erhöhte TUNEL-Expression bei Lebergeweben, die mit dem ‚leeren‘ Kontrollvirus infiziert wurden, verglichen mit den TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA behandelten Schnitten detektiert werden (Abb. 19)

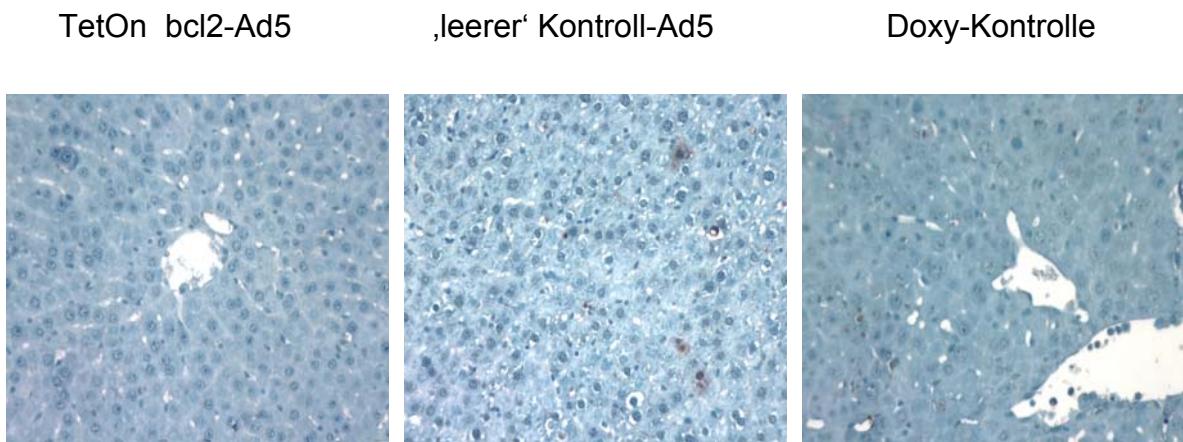
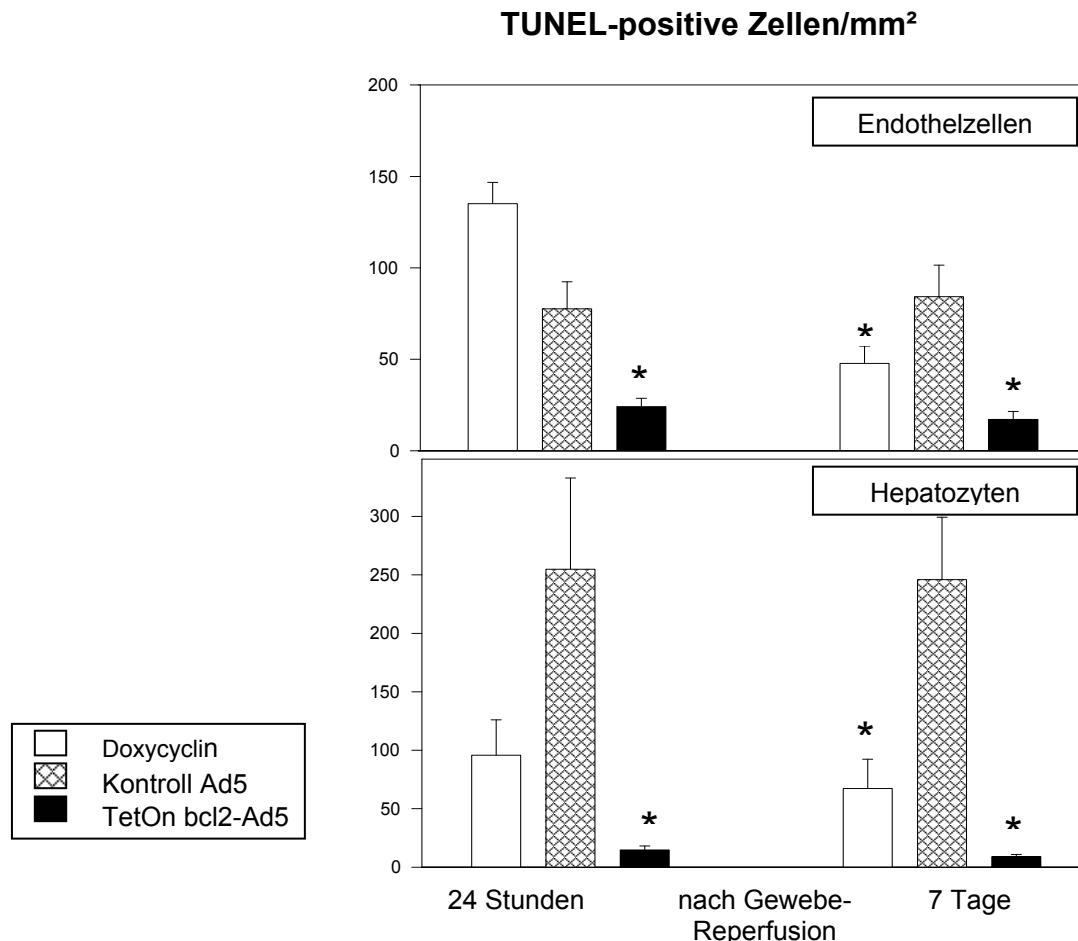


Abb. 19: TUNEL-gefärbte Leberschnitte

24 Stunden nach Transplantation nach adenovialem bcl-2 Transfer (links), Kontrollvirustransfer (mitte) (Gollackner, Sedivy et al.), bzw. nach Behandlung ausschließlich mit Doxycyclin (rechts), wurden in allen untersuchten Lebergeweben TUNEL-positive Zellen gefunden. Nur sehr wenige TUNEL-positive Zellen konnten in den mit bcl-2-behandelten Leberschnitten im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Die Behandlung mit dem Kontroll-adenoviralen Konstrukt hatte eine höhere Anzahl an TUNEL-positiven Zellen zur Folge. Dies zeigte sich sowohl in Sinusoidzellen als auch in Hepatozyten (siehe Abb.: 20)



Anzahl TUNEL-positiver Zellen/ mm ²		
Zeit nach Transplantation	24 Stunden (n=4)	7 Tage (n=8)
Sinusoidalzellen		
Doxyccyclin	135.1 ± 11.6	47.9 ± 9.4 ^a
Kontroll-Ad5	77.5 ± 14.7	84.2 ± 17.2
TetOn bcl-2 Ad5/ rt-TA	24.1 ± 4.4 ^b	17.1 ± 4.3 ^b
Hepatozyten		
Doxyccyclin	95.1 ± 30.2	67.2 ± 25.0 ^a
Kontroll Ad5	254.7 ± 78.0	246.0 ± 53.3
TetOn bcl-2 Ad5/ rt-TA	14.6 ± 3.4 ^{c,d}	8.9 ± 7.0 ^a

^a p < 0,0001 vs. Kontroll Ad5

^b p < 0,0001 vs. Kontroll Ad5 und Doxyccyclin

^c p < 0,05 vs. Kontroll Ad5

^d p < 0,0001 vs. Doxyccyclin

Abb 20: TUNEL-positive Zellen/mm²

Sinusoidalzellen und Hepatozyten nach Behandlung mit Doxyccyclin allein, dem Kontroll Ad5 und TetOn bcl2-Ad5 nach 24 Stunden und 7 Tagen.

2. Western Blot

Ein *in vitro* Gentransfer von TetOn bcl2-Ad5 ergab eine mittels Doxycyclin induzierbare bcl-2-Expression in 293 TetOn-Zellen. Dies konnte in den Kontrollzellen ohne Doxycyclin nicht nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um ein Tetrazyclin-Derivat mit geringer Zytotoxität (Gossen and Bujard 1992; Gill, Krueger et al. 2002; Knott, Druessel et al. 2005), bekannt für eine schnelle kontrollierte Isolation von Klonen (Kuhnel, Fritsch et al. 2004). Um diesen *in vitro* erfolgten Gentransfer sichtbar zu machen, diente diese Westernblot-Analyse nach jeweils 0 und 24 Stunden. Damit konnte auf Proteinebene eine erfolgreiche bcl-2-Expression nachgewiesen werden. Der Gentransfer führte zur Expression von bcl-2 in Anwesenheit von Doxycyclin in 293-Zellen und primären Rattenhepatozyten (Abb. 21a). Das Verdünnungsverhältnis von TetOn bcl2-Ad5 zu rt-TA von 4:1 ergab die höchste Proteinexpressionsrate. Dieser Nachweis erfolgte in primären Rattenhepatozyten (Abb. 21b). Zusätzlich war das Ausmaß der bcl-2-Expression abhängig von der zugefügten Menge von Adenoviren, mit denen die primären Rattenhepatozyten infiziert wurden.

Die Transfektion der Zellen mit dem TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA-Konstrukt resultierte in einer bcl-2- Expression nach Gabe von Doxycyclin *in vitro*.

Abb. 21 (a) rt-TA : TetOn bcl-2

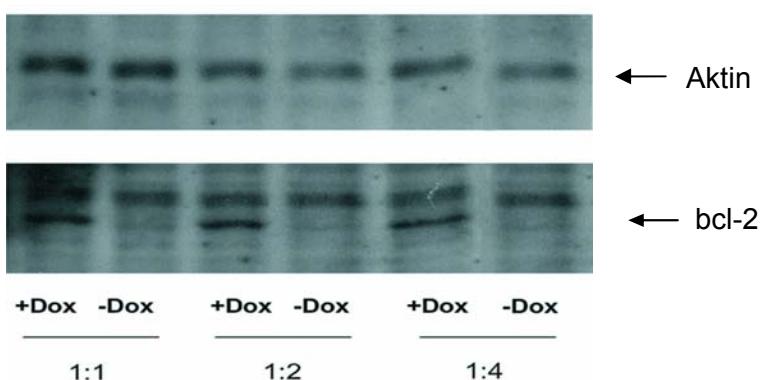


Abb. 21 (b)

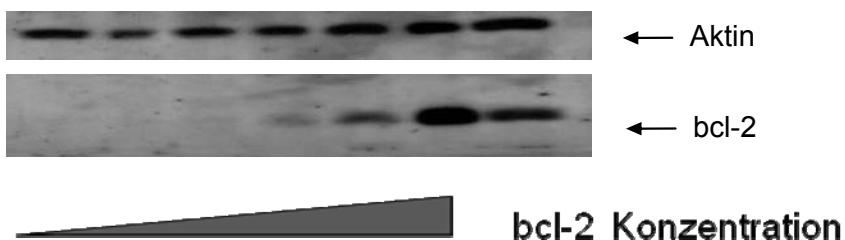


Abb. 21:

- (a) Die Westernblotanalyse zeigt eine mit Doxycyclin induzierbare Expression von bcl-2 in 293-Zellen. Der obere Westernblot auf Aktin diente als Ladungskontrolle. Das optimale Ergebnis der bcl-2-Expression konnte bei einem Verhältnis von 4:1 (TetOn bcl2 Ad5 zu rt-TA) erreicht werden. Ohne die Gabe von Doxycyclin war kein Nachweis einer bcl-2-Expression möglich.
- (b) Anhand des Bandenmusters wird deutlich, dass die Expression des bcl-2-Proteins mit dem Grad der MOI in primären Rattenleberzellen und der Doxycyclin-Konzentration zunimmt.

3. PCR

Zum Nachweis des mittels adenovialem Gentransfer eingeschleusten bcl-2 diente auf DNA-Ebene das PCR-Verfahren. Im Folgenden werden die Ergebnisse bezogen auf die Anwesenheit von Neutrophilen, Makrophagen (MPO-Expression, TNFa-Expression, CD163-Expression), CD4-positiven T-Zellen, CD8-positiven T-Zellen und B-Zellen ausgewertet.

3.1. Neutrophile Zellen und Makrophagen

3.1.1. MPO

Die MPO-Expression war nach Vorbehandlung mit dem Kontroll Ad5 im Vergleich zu TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA nach 24 Stunden deutlich geringer. MPO, der als Marker von Neutrophilen gilt, war sichtlich reduziert, nachdem das Lebergewebe nach 24 Stunden und auch 7 Tagen statt nur mit Doxycyclin mit Kontroll Ad5 behandelt wurde. Hierbei waren die MPO-Level in TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA nach 24 Stunden ein wenig höher und gingen in den Levels der nach 7 Tagen mit Kontroll Ad5 behandelten Lebergeweben ein wenig zurück (Abb. 22a).

3.1.2. Expression von CD163

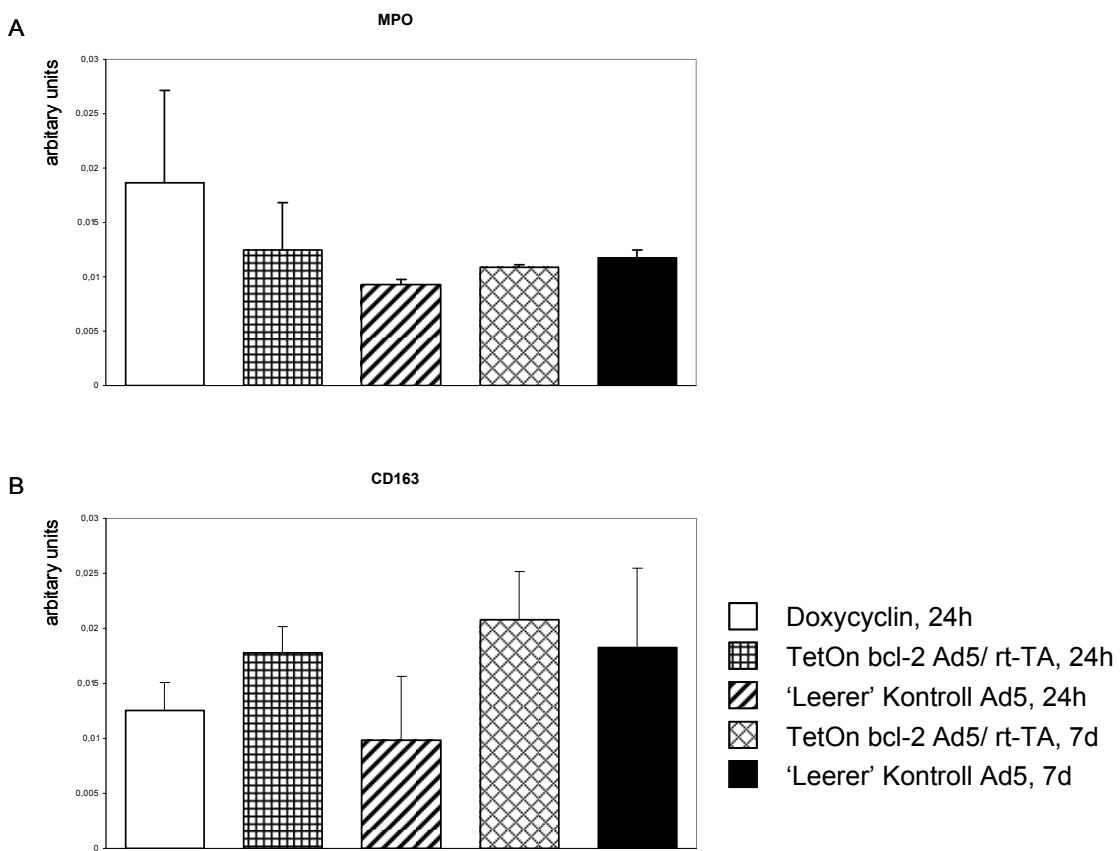
Die CD163-Expression wurde durch die Transplantation mit adenovirally infizierten Organen nicht erhöht. CD163 ist ein Makrophagen-Marker, bei dem 24 Stunden nach Transplantation weder in mit Kontroll Ad5 behandelten Proben, noch in TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA-Schnitten eine bezeichnende Differenz der CD163-Expression messbar

war. Auch nach 7 Tagen konnte zu den Kontrolllebern keine unterschiedliche CD163-Expression festgestellt werden (Abb. 22b).

3.1.3. TNF α - Expression

Die TNF α -Expression konnte in der mit dem ‚leeren‘ Kontroll Ad5 behandelten Leber als erhöht nachgewiesen werden. In TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA -Lebern konnte nach 24 Stunden und 7 Tagen jedoch keine TNF α -Erhöhung ermittelt werden.

Der Gentransfer des Kontroll Ad5 resultierte verglichen mit den Doxycyclin-Kontrolllebern in erheblich erhöhten TNF α -Leveln (mehr als 3 pro Feld). Diese Differenz war nach 24 Stunden (0.0005 ± 0.00002 vs. 0.0001 ± 0.0002 A.U.) prominenter als nach 7 Tagen (0.0002 ± 0.0001 A.U.). In den TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA Lebern war kaum ein vermehrter TNF α -Spiegel messbar. Zusätzlich war die Expression von bcl-2 nicht nur mit der Aufhebung der intrahepatischen Apoptose assoziiert, sondern auch mit einer reduzierten TNF α -Expression unabhängig von der adenoviralen Infektion der Leberzellen (Abb. 22c).



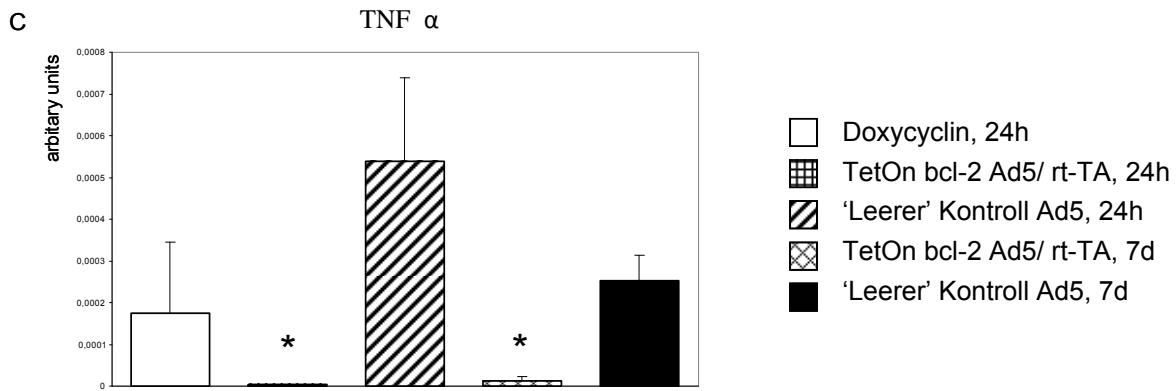


Abb. 22: Quantitative RT-PCR

3.2. CD4-positive Zellen

CD4-positive T-Zellen waren nach der Behandlung mit Adenoviren unabhängig von der bcl-2-Expression vermindert.

Im Vergleich zu den Kontrollen, die nur mit Doxycyclin versehen wurden, resultierten beide Proben, die zusätzlich mit Kontroll Ad5 auf der einen Seite und mit TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA auf der anderen Seite behandelt wurden, nach 24 Stunden mit einer verminderten Expression von CD4 (Abb. 23a).

3.3. CD8-positive Zellen

Die Menge der CD8-positiven T-Zellen in den transplantierten Lebern war nach Infektion mit TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA nach 24 Stunden stark reduziert, nicht jedoch nach 7 Tagen. Im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen und den mit Kontroll Ad5 behandelten Lebern konnte nach Ko-Infektion mit rt-TA ein verminderter CD8-Spiegel nachgewiesen werden. Nach sieben Tagen war diese Verminderung in den Gruppen mit TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA deutlicher zu sehen als in mit dem Kontroll Ad5 behandelten Lebern (Abb. 23b).

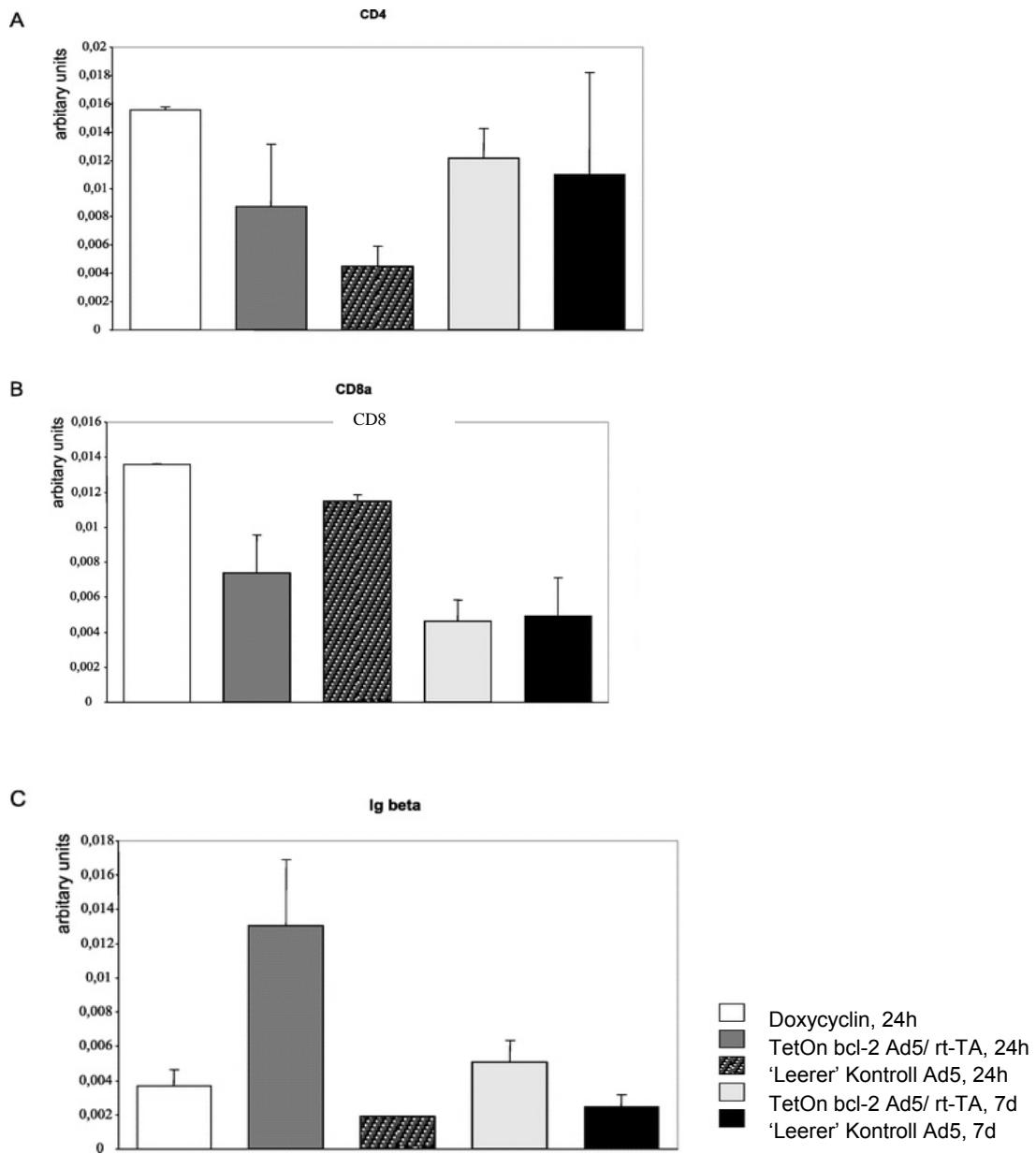


Abb.23 T- und B-Zellakkumulation

Abb. 23: T- und B-Zellakkumulation. Bestimmung der Gewebeinfiltration von T-Zellen mittels quantitativer RT-PCR von CD4 und CD8.

Während der Unterschied der CD4-Expression innerhalb der Gruppen nicht signifikant war, war die intrahepatische CD8-Expression deutlich nach einer Behandlung mit dem bcl-2-kodierenden Adenovirus und dem Kontrolladenovirus vermindert, verglichen mit den Lebergeweben, die mit Doxycyclin behandelt wurden. Vier Untersuchungen pro Gruppe (Abb. A, B). Obwohl eine hohe Expression von Ig β 24 Stunden nach bcl-2 Überexpression evident war, war dieser Unterschied nicht signifikant zu den andern Gruppen (Abb. C).

3.4. B-Zellen

Genau wie die schon genannten Immunzellen waren auch B-Zellen in mit TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA behandelten Lebern sowohl nach 24 Stunden als auch 7 Tagen erniedrigt. 24 Stunden nach Transplantation ergab die Aufbereitung der Leber mit TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA eine 3,6- und 7,2-fache Erhöhung der Ig β -Niveaus, die als Marker für B-Zellen wirken (0.013 ± 0.008 A.U. vs. 0.0036 ± 0.002 A.U. (Doxycyclin und 0.0018 ± 0.000001 A.U. Kontroll Ad5). In den mit Kontroll Ad5 verarbeiteten Lebern waren die Ig β -Niveaus sogar geringer als in den nicht-infizierten Doxycyclin-Lebern. 7 Tage nach Transplantation wurden die Unterschiede in der Ig β -Expression erneut bestätigt. B-Zellen werden durch follikuläre dentritische Zellen aktiviert, die virale Capsid-Antigene präsentieren. Die aktivierte B-Zellen können dann die Aktivität von CD4-T-Helferzellen triggern. Die Helfer-Funktion von CD4, die die Differenzierung von B-Zellen zu Immunglobulin-sekretierenden Zellen induzieren, stellen ein ko-stimulierendes Signal dar (z.B. B7CD28 oder CD40-CD40L).

Wenn einmal T_H1- oder T_H2-Zellen zu CD4-Zellen proliferiert sind, so kann CD4 die B-Zell-Differenzierung in Antikörper sezernierende Plasmazellen via IL-4 abhängige Stimulation bewirken (Kiuchi, Schlitt et al. 1997). Interessanterweise war in diesem Versuch die Ig β -Expression in der mit Kontroll Ad5 behandelten Gruppe nicht signifikant verändert, jedoch in dem Versuch mit TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA 24 Stunden nach Transplantation erhöht.

4. Immunhistochemie

Im Folgenden werden Leberparaffinschnitte auf ihre unterschiedlich starke Färbung der Immunzellen unter dem Mikroskop ausgewertet. Die Auflistung zeigt die Lokalisation und Häufigkeit der gefärbten Immunzellen in Abhängigkeit verschiedener Versuchsbedingungen und Versuchstiere. Dabei erfolgt eine detaillierte Auswertung der Immunreaktionen mit dem CD4-Antikörper (Abb. 25), CD8-Antikörper (Abb. 26) und dem CD45RA-Antikörper (Abb. 26).

Nach Etablierung dieser drei verwendeten Antikörper an Thymusgewebe (Abb. 24a, 24b) aus Ratten in Vorversuchen konnten die positiv- und negativ-Kontrollen für die folgenden Versuchsreihen gewonnen werden. Alle Versuchstiere wurden dabei in 8 verschiedene Gruppen unterteilt, die sich in den Versuchsbedingungen wie Virus-

Applikation, Ko-Infektion, Verabreichung von Doxycyclin oder dem Tag der Organentnahme unterscheiden.

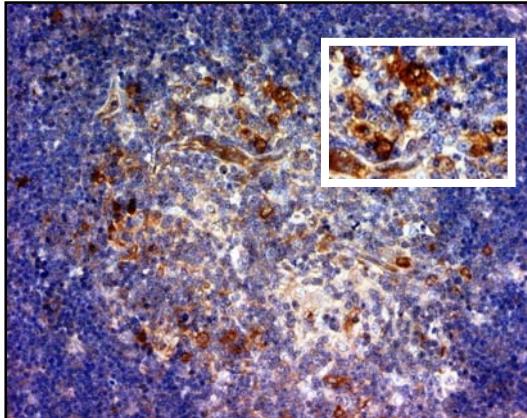


Abb. 24a Thymus: positiv-Kontrolle

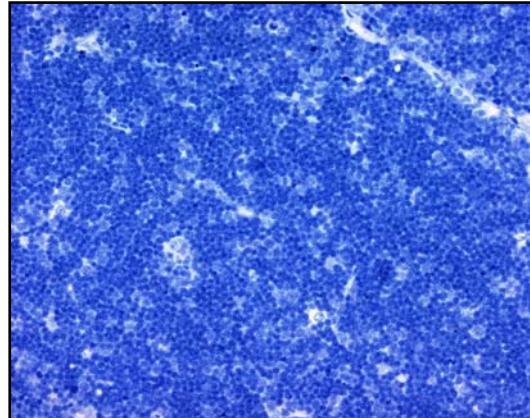


Abb. 24b Thymus: negativ-Kontrolle

Abb. 25: CD4-Antikörper: Verdünnung 1:100; Inkubation über Nacht bei 4°C

Versuch	Tier-Nr.:	Färbeverhalten der Leberschnitte	
1: unbehandelte Tiere	0	-	Erwartungsgemäß keine positive Immunreaktion bei dem Kontrollversuchstier Nr. 0
2: Doxycyclin Ø transplantiert	12 13	(+) + z	Im Lebergewebeschnitt des Versuchstiers Nr. 12 wurden mäßig gefärbte Immunzellen im Lichtmikroskop beobachtet, was aber eher einer Hintergrundreaktion entsprach. Gleiche Ergebnisse zeigten sich in den Schnitten von Tier Nr. 13, jedoch mit einer etwas zentraleren Verteilung des Färbemittels.
3: bcl-2 Ad5 rt-TA-Ko-Infektion Doxycyclin nach 7d OE	14 18 22 26 27	++ z, G (+) - - (+)	Bei dieser Versuchsreihe war ein unterschiedliches Färbemuster in den verwendeten Schnitten ersichtlich. Eine wie zu erwarten schwache bis gar keine Färbung zeigte sich bei den Tieren 18, 27 und 22, 26. Das falsch positive Ergebnis von Tier Nr. 14 führen wir auf die schlechte Qualität des Paraffinschnittes zurück.
4: Kontroll Ad5 rt-TA Ko-Infektion Doxycyclin nach 7d OE	32 37 42 47	- + z (+) (+)	Bei dieser Gruppe war die stärkste Immunreaktion zu erwarten, da den Versuchstieren kein bcl-2 verabreicht wurde. Zusätzlich ermöglichte der lange Zeitraum von 7 Tagen bis zur Organentnahme eine starke Immunantwort. Mit Ausnahme des Tieres Nr. 32 konnte eine gleichmäßige positive Färbung beobachtet werden.

5: bcl-2 Ad5 rt-TA Ko-Infektion Doxycyclin nach 24h OE	52 57 62 67	- + z ++ G -	Eine durchwegs ungleichmäßige Anfärbung der Immunzellen ergab sich bei den Tieren Nr. 52, 57, 62 und 67, da die einzelnen Schnitte bezüglich einer sehr starken und keiner Färbung differierten.
6: Kontroll Ad5 rt-TA Ko- Infektion Doxycyclin nach 24h OE	68 72 89	(+) G - -	Der Leberschnitt von Tier Nr. 68 lieferte eine wie zu erwartende positive Farbreaktion, besonders in der Peripherie. Die Immunreaktion in den Lebern der Tiere Nr. 72 und 89 fiel so gering aus, dass sie mit der Methode der Immunhistochemie nicht nachgewiesen werden konnte.
7: bcl-2 Ad5 rt-TA Ko- Infektion Doxycyclin nach 7d OE Ø transplantiert	93	-	Versuchstier Nr. 93 lieferte keine positiven Werte.
8: Doxycyclin transplantiert	0	-	Eine Farbreaktion bei Tier Nr. 104 war nicht zu beobachten.

OE: Organentnahmen

z: zentrale Färbung

G: Färbung des gesamten Gewebes

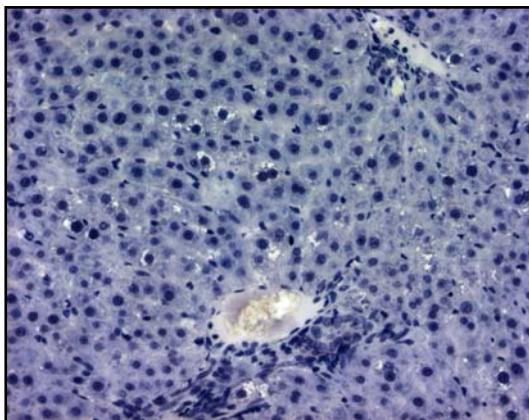


Abb. 25a:
Tier Nr. 27, CD4-Antikörper

Nach Behandlung mit bcl-2 Ad5 keine Färbung von Immunzellen mikroskopisch erkennbar

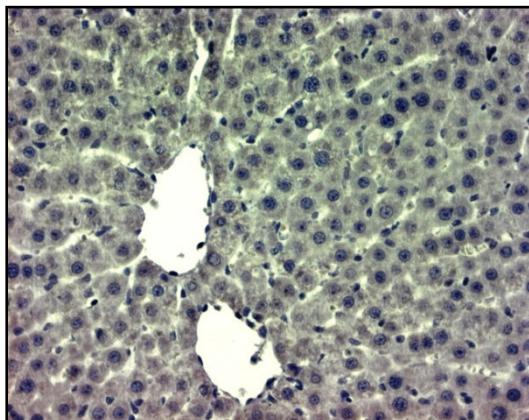


Abb. 25b:
Tier Nr. 37, CD4-Antikörper

Flächige Färbung des Parenchyms v.a. im Bereich des Portalfeldes nach Infektion mit dem 'leeren' Kontroll Ad5

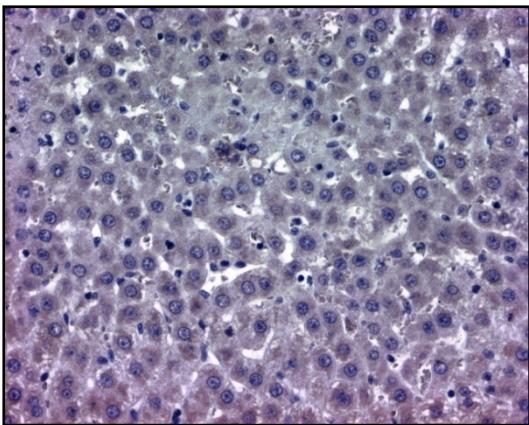


Abb. 25c:
Tier Nr. 62, CD4-Antikörper

Ungleichmäßiges, jedoch wie zu erwarten
spärliches Färbemuster der Hepatozyten
nach Infektion mit bcl-2

Abb. 26: CD8–Antikörper: Verdünnungsverhältnis 1:20, Inkubation 1h bei RT

Versuch	Tier-Nr.:	Färbeverhalten der Leberschnitte	
1: unbehandelte Tiere	0	-	Das Kontrolltier Nr. 1 lieferte positive Färbeergebnisse unter dem Mikroskop
2: Doxycyclin Ø transplantiert	12	+	Eine starke Farbreaktion war in der zweiten Versuchsgruppe zu erkennen, wobei bei Versuchstier Nr. 13 im Vergleich zu Tier Nr. 12 noch eine stärker ausgeprägte zentrale Färbung ersichtlich war.
3: bcl-2 Ad5 r-TA-Ko-Infektion Doxycyclin nach 7d OE	14 18 22 26 27	++ + (+) +++ z -	Positive Werte lieferten die Schnitte der Versuchstiere der Gruppe 3. Insbesondere Tier Nr. 14, 18 und 26 fielen durch ihre starke Färbung auf, während bei Tier Nr. 22 und 27 eher weniger angefärbte Zellen zu sehen waren.
4: Kontroll Ad5 rt-TA Ko-Infektion Doxycyclin nach 7d OE	32 37 42 47	(+) (+) - (+)	Eine nahezu homogene Färbung fiel bei den Tieren Nr. 32, 37, und 47 auf. Die Farbreaktion von den Schnitten von Versuchstier Nr. 42 war negativ.
5: bcl-2 Ad5 rt-TA Ko-Infektion Doxycyclin nach 24h OE	52 57 62 67	(+) (+) - -	Den Erwartungen entsprechend zeigten Leberschnitte der Tiere Nr. 52 und 57 schwache Färbungen. Dagegen waren bei Tier Nr. 62 und 67 nahezu keine Farbreaktionen zu beobachten.
6: Kontroll Ad5 rt-TA Ko-Infektion Doxycyclin nach 24h OE	68 72 89	- - -	Die Auswertung des Färbeverhaltens der Gewebeschnitte der Tiere Nr. 68, 72 und 89 fiel durchwegs negativ aus.

7: bcl-2 Ad5 rt-TA Ko-Infektion Doxycyclin nach 7d OE Ø transplantiert	93	-	Tier Nr. 93 zeigte positives Färbeverhalten in der immunhistochemischen Untersuchung.
8: Doxycyclin, transplantiert	0	+	Das nicht behandelte und nicht transplantierte Versuchstier Nr. 104 lieferte keine positiven Werte

OE: Organentnahme z: zentrale Färbung G: Färbung des gesamten Gewebes

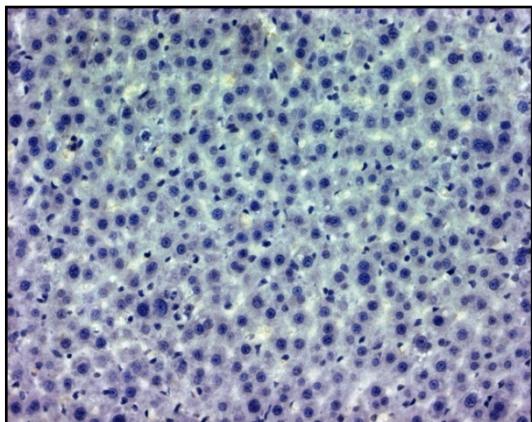


Abb. 26a:
Tier Nr. 27, CD8-Antikörper

Keine Färbung der Hepatozyten nach Infektion mit bcl-2 Ad5

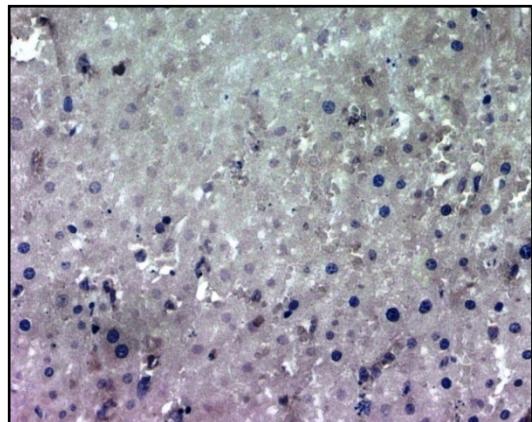


Abb. 26b:
Tier Nr. 67, CD8-Antikörper

Unspezifisches Färbemuster, das auf eine bcl-2-induzierte Reduktion der Immunantwort hinweist

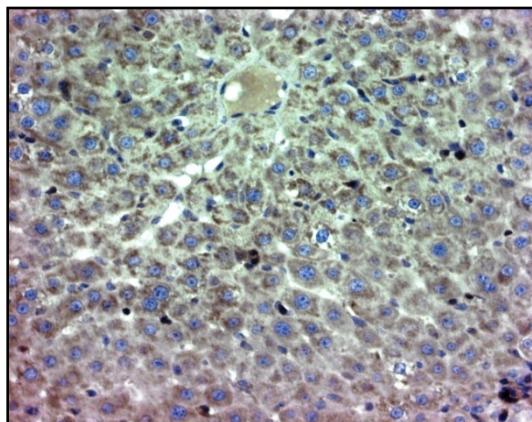


Abb. 26c:
Tier Nr. 37, CD8-Antikörper

Starke Farbreaktion nach Infektion mit dem 'leeren' Adenovirus und Organentnahme nach 7 Tagen

Abb. 27: CD45RA-Antikörper: Verdünnung 1:25; Inkubationszeit von 30min bei 37°C

Versuch	Tier-Nr.:	Färbeverhalten der Leberschnitte	
1: unbehandelte Tiere	0	-	Wiederum waren beim Kontrolltier Nr. 0 keine gefärbten Immunzellen zu erkennen.
2: Doxycyclin Ø transplantiert	12 13	- -	Weder bei Tier Nr. 12 noch bei Tier Nr. 13 konnten positive Farbreaktionen beobachtet werden.
3: bcl-2 Ad5 r-TA-Ko-Infektion Doxycyclin nach 7d OE	14 18 22 26 27	- - - + -	Bis auf Versuchstier Nr. 26 lieferten alle anderen Tiere dieser Versuchsgruppe (Nr. 14, 18, 22, 27) keine positiven Ergebnisse im Bezug auf ihr Färbeverhalten.
4: Kontroll Ad5 rt-TA Ko-Infektion Doxycyclin nach 7d OE	32 37 42 47	- - - -	Aufgrund schlechter Qualität der Schnitte, deren Farbreaktion durchwegs negativ ausfiel, kann das Ergebnis nicht gewertet werden.
5: bcl-2 Ad5 rt-TA Ko-Infektion Doxycyclin nach 24h OE	52 57 62 67	(+) - - -	Eine leicht positive Färbung war bei Tier Nr. 52 nachweisbar, die Schnitte der Tiere Nr. 57, 62 und 67 zeigten kein Färbeverhalten.
6: Kontroll Ad5 rt-TA Ko-Infektion Doxycyclin nach 24h OE	68 72 89	+	Die Werte der Versuchstiere Nr. 68 und 89 waren stark bis mäßig positiv. Keine gefärbten Zellen waren bei den Schnitten des Lebergewebes von Versuchstier Nr. 72 nachweisbar.
7: bcl-2 Ad5 rt-TA Ko-Infektion Doxycyclin nach 7d OE Ø transplantiert	93	-	Keine Farbreaktion bei Versuchstier Nr. 93.
8: Doxycyclin, transplantiert	0	-	Die Suche nach gefärbten Zellen im Falle des Versuchstiers Nr. 104 viel negativ aus.

OE: Organentnahme

z: zentrale Färbung

G: Färbung des gesamten Gewebes

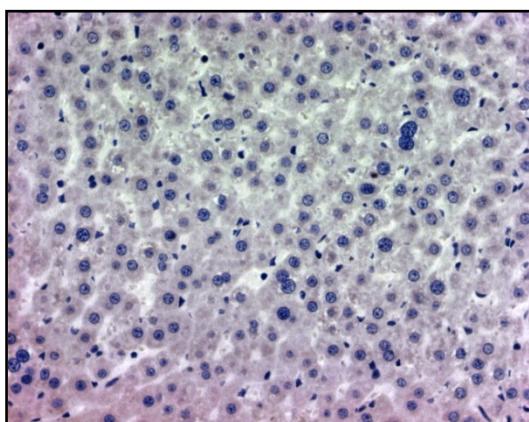


Abb. 27a:
Tier Nr. 14, CD45RA-Antikörper

Negative Färbung der Zellen nach Infektion mit bcl-2 Ad5 und Organentnahme nach 7 Tagen

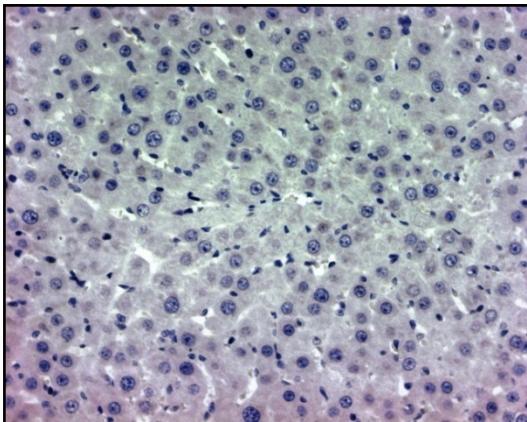


Abb. 27b:
Tier Nr. 67, CD45RA-Antikörper

Keine gefärbten Zellen nach Infektion mit bcl-2 und Organentnahme nach 24 Stunden

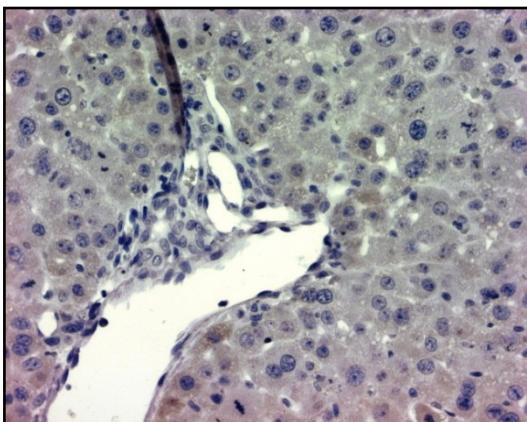


Abb. 27c:
Tier Nr. 68, CD45RA-Antikörper

Positives Färbemuster nach Infektion mit dem leeren Adenovirus mit Organentnahme nach 24 Stunden

4.1. CD4

Die Färbung von CD4 in mit Doxycyclin behandelten Lebern war jeweils nach 24 Stunden mit einem Durchschnittswert von 0,5 gering, in mit TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA angereicherten Lebern bei 1,25 und 0,25 in Geweben, die mit Kontroll Ad5 versehen waren. Nach 7 Tagen konnte man eine Färbung des CD4 von 1 in TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA behandelten Lebern nachweisen, sowie einen Wert von 0,875 bei Kontroll Ad5–Lebern.

4.2. CD8

Die Färbung von CD8 wurde in Doxycyclin–Lebern mit einem Wert von 1 gemessen, 0,75 in TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA und 0,25 in Kontroll Ad5-Schnitten, ebenfalls jeweils nach 24 Stunden. 7 Tage später erhöhten sich die Spiegel in TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA auf 1,75 und in Kontroll Ad5-Schnitten auf 0,75.

4.3. CD45RA

In keinem der Schnitte konnten CD45-positive Zellen nachgewiesen werden.

5. Exkretorische Funktion des Transplantats

Der Gallenfluss während der ersten 90 Minuten nach Portalvenen-Reperfusion wurde als ein primärer Parameter der frühen Transplantatfunktion gemessen. Mittels Varianzanalyse ANOVA wurden signifikante Unterschiede zwischen dem Kontroll-Adenovirus und der bcl-2-Gruppe aufgedeckt. Durchschnittliche Gallenfluss-Level (gemessen als ml/90 min/100 g Lebergewebe) von $2,15 \pm 0,89$ (nur Adenovirus), $5,06 \pm 0,68$ (Adenovirus und bcl-2 bei $P=0,002$) und $1,7 \pm 0,4$ (keine Infektion) konnten gemessen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass eine bcl-2-Expression die exkretorische Funktion schnell nach Transplantat-Reperfusion beeinflusst.

6. Überleben der Versuchstiere

Zusätzlich zum Schutz vor apoptotischem Zelltod verbesserte der bcl-2-Transfer signifikant das Überleben der Versuchstiere nach Lebertransplantation nach einer kalten Ischämiezeit von 16 Stunden. Verglichen mit einer Überlebensrate von 50% ($P<0,04$) in den Kontrollgruppen spiegelt ein Überleben von 100% der Versuchstiere nach bcl-2-Transfer den erheblich verbesserten Zustand des transplantierten Organs wieder. Das Überleben der Versuchsratten in den Kontrollgruppen stimmte völlig mit den vorausgegangenen Versuchen überein, die ein 50%iges Überleben nach einer kalten Ischämiezeit von 16 Stunden aufzeigten. Die Autopsie der toten Tiere deckte in allen Fällen starke Leberschäden auf. Ein Versuchstier in der mit TetOn bcl2-Ad5 behandelten Gruppe starb an Transplantat-unabhängigen Komplikationen (Mesenterialinfarkt) und musste aus den experimentellen Analysen entfernt werden (Abb. 28).

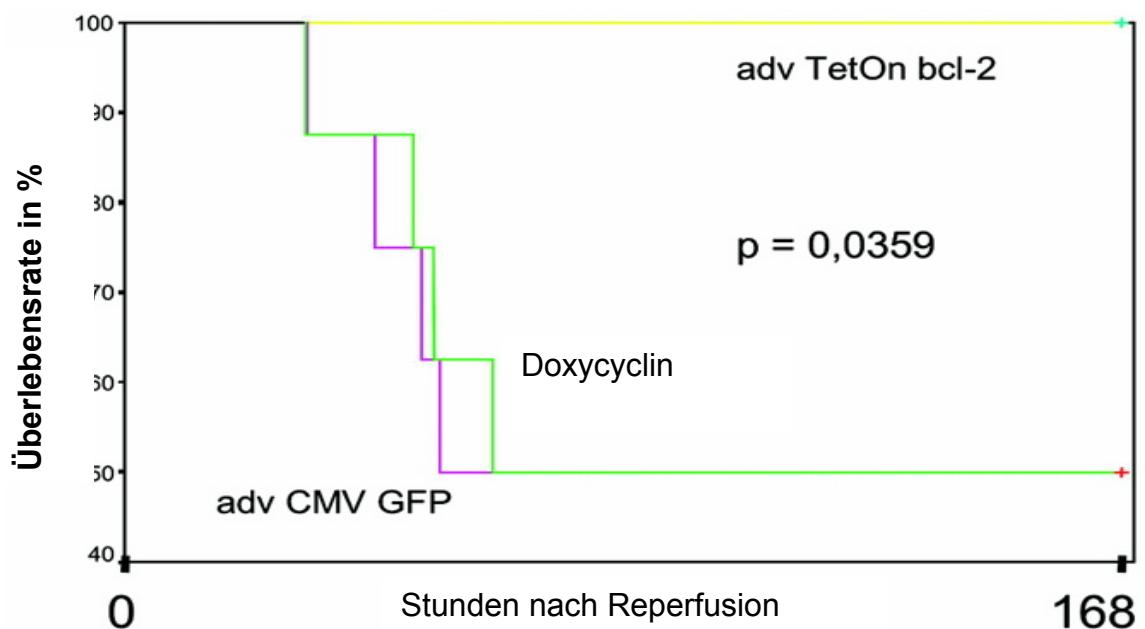


Abb. 28: Kaplan-Meier-Darstellung der Überlebensrate der Versuchstiere.

Die Überlebensrate 7 Tage nach Transplantation in der Gruppe, die mit TetOn bcl2-Ad5 behandelt wurde, lag bei 100%. Im Vergleich dazu war das Überleben in der mit „leeren“ Ad5 infizierten Gruppe mit 50% deutlich vermindert, ebenso wie in der mit Doxycyclin-behandelten Gruppe ($P < 0,04$ vs. Beide Gruppen).

E. DISKUSSION

1. Verminderte Apoptoserate in Abhängigkeit vom Grad der bcl-2 Expression

Die TUNEL-Farbemethode diente zum Nachweis apoptotischer Zellen in den verwendeten Leberschnitten. Dabei zeigte sich bei allen Gewebeschnitten eine positive Färbung. Jedoch konnte in Lebergeweben, die mit bcl-2 vorbehandelt worden waren, nach Transplantation im Mikroskop eine geringere Anzahl TUNEL-positiver Zellen im Vergleich zu den Doxycyclin-Kontrollen beobachtet werden. Das bestätigt die Vermutung, dass das als anti-apoptotisch wirksame bcl-2 tatsächlich in den Zellen des transplantierten Organs exprimiert wurde und diese somit vor dem Zelltod weitestgehend schützt. Gestützt wird diese Aussage durch die Beobachtung der maximalen Apoptoserate bei Lebergeweben, die mit dem leeren Ad5, eben ohne das Insert bcl-2 infiziert wurden. Dies gilt auch im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die nur Doxycyclin erhielten. Sowohl bei Endothelzellen als auch bei Hepatozyten blieb der positive Effekt von bcl-2 einmal nach 24 Stunden, sowie nach 7 Tagen nach Gewebereperfusion erhalten. Nach bcl-2-Expression war so die Anzahl positiv gefärbter Zellen deutlich erniedrigt. Entsprechend diesem Ergebnis wendeten wir ein Modell zur Untersuchung des Effekts von bcl-2 bei warmer hepatischer Ischämie an (Bilbao, Contreras et al. 1999). Die Bedeutung eines unspezifischen Gewebeschadens nach Virusapplikation vor Transplantation mag sich möglicherweise durch kalten Ischämie- und Reperfusionsschaden im Lebergewebe vervielfacht haben.

In einem weiteren Versuch unter Verwendung der TUNEL-Färbung wurden ebenfalls positiv gefärbte Zellen in Abhängigkeit von bcl-2-Transfektion und Doxycyclin-Gabe im Vergleich zu Kontrollgruppen nachgewiesen. Wie in den vorhergehenden Versuchen blieb die Architektur des Parenchyms nach bcl-2-Induktion erhalten (Kulkarni and Cronin). Unsere Untersuchungen ergaben auch, dass der Grad der bcl-2-Expression in Hepatozyten von der Infektionsrate der Zellen abhängig ist. Dennoch hat eine Überexpression des anti-apoptotisch wirkenden bcl-2 nicht notwendigerweise einen gesteigerten anti-apoptotischen Effekt auf Leberzellen, obwohl ein pro-proliferativer Effekt in der frühen Phase der Leber-Regeneration als gesichert gilt (Takushi, Shiraishi et al. 2006). Auch Oshiro beschreibt die anti-apoptotischen Aktivitäten des bcl-2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als kontrovers, da eine Überexpression des Proteins paradoxeise einen pro-apoptotischen Effekt in

der reperfundierte Leber hat (Oshiro, Shiraishi et al. 2002). Der Grad der Expression von bcl-2 darf somit nicht einseitig bewertet und nur als positiv eingeschätzt werden, da sowohl die Expressions-Level als auch das Zielorgan von großer Bedeutung sind. Wang und sein Team beschäftigten sich im Jahre 2004 mit dem Problem der Apoptose von Spenderhepatozyten und fanden heraus, dass der Untergang der Leberzellen über Fas-gesteuerte Signalwege erfolgt und somit eine genetische bcl-2-Modifikation Leberzellen vor Apoptose schützt. Dies wird dadurch erreicht, dass eine gesteigerte bcl-2 Expression die Hepatozyten gegen eine Fas-Liganden-induzierte Apoptose resistent macht (Wang, Li et al. 2004). Diese Idee einer neuen Behandlungsmethode von akutem Leberversagen nach Transplantation führten wir in unseren Untersuchungen weiter.

2. Erhöhte bcl-2-Expression nach Transfektion mit TetOn bcl2-Ad5 und Doxycyclin-Gabe

Das bekannte Modell der Doxycyclin-induzierbaren Expression von bcl-2 in 293-Zellen wurde in unseren Versuchen auf Rattenleberzellen angewandt und unter gleichen Bedingungen bestätigt. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von bcl-2 mit dem Grad der MOI in primären Rattenleberzellen zunimmt. Diese Ergebnisse beweisen einen positiven Transfer von bcl-2 über den adenoviralen Vektor gemäß dem Protokoll in Hepatozyten nach und bestätigen, dass das Protein bcl-2 tatsächlich translatiert wurde. Die Western-Blot-Analyse zeigte in unserem Experiment keine bcl-2-Expression in Abwesenheit von Doxycyclin *in vitro*. So wurde bisher sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein erfolgreicher Gentransfer in verschiedensten Zielorganen durchgeführt. Im Vergleich zu anderen Geweben hat sich das Lebergewebe als ein mit am besten geeignetes Organ für einen adenoviralen Transfer *in vivo* herausgestellt (Merrick, Shewring et al. 1996; Pickles, McCarty et al. 1998). Selbst bei wie oben genannter direkter Injektion des Vektors in ein Zielorgan, wie zum Beispiel Herz oder Niere, oder nach systemischer Gabe, zeigt sich die höchste transgene Expressionsrate nach wie vor in der Leber (Kass-Eisler, Falck-Pedersen et al. 1994). Obwohl eine Gentherapie mit Adenoviren häufig zu Schäden im behandelten Gewebe führt, konnte dennoch nachgewiesen werden, dass gerade in entzündetem Gewebe die Transferrate erhöht ist (Rekhter, Simari et al. 1998; Fechner, Haack et al. 1999). Dies hat eine positive therapeutische

Konsequenz für den im Rahmen der Transplantation auftretenden Ischämie- und Reperfusionsschaden, was Grundlage unserer Untersuchungen war.

3. Modifizierte Immunantwort des Empfängers nach Transplantation einer adenoviral-infizierten Leber und bcl-2-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde erörtert, wie die Transplantation einer adenoviral infizierten Leber in einer veränderten Immunantwort des Empfängerorganismus resultiert. Dabei wird möglicherweise die immunologische Reaktion durch die intrahepatische Expression von bcl-2 moduliert. Eine verminderte Apoptoserate nach einem adenoviralen bcl-2-Transfer wurde bewiesen, was in direkter Verbindung mit reduzierten TNF α -Levels und sichtbar verbesserten IgG-Levels im transplantierten Organ steht. Folglich konnte die Reduktion des programmierten Zelltodes nach Ischämie- und Reperfusionsschaden auch die immunologische Antwort nach Lebertransplantation beeinflussen. Daneben ist in Studien gesichert, dass die vom Lebertransplantat ausgelöste Immunantwort auch vom Transplantat selbst moduliert wird (Knolle and Gerken 2000). Das anhand publizierter Studien bekannte orthotope Lebertransplantationsmodell OLT wurde in dieser Arbeit verwendet (Sumimoto, Jamieson et al. 1989; Gao, Lemasters et al. 1993; Rentsch, Beham et al. 2001; Rentsch, Kienle et al. 2005). Der Einfluss einer allogenen Transplantat-Abstoßung wurde durch den Gebrauch von gen-identischen Lewis Ratten vereinheitlicht. Daher spiegeln die in unseren Experimenten beobachteten immunologischen Reaktionen die Antwort auf Stimuli wie Organentnahme, kühle Aufbewahrung und Reperfusion ebenso wie adenovirale Infektion des Gewebes im Spender wider.

Nach adenoviraler Infektion zeigt sich innerhalb 24 Stunden als erste Phase der Körperabwehr die Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit der Rekrutierung von Neutrophilen, NK-Zellen, Makrophagen (Liu and Muruve 2003) und Kupffer-Zellen, die virale Vektoren aufnehmen und pro-inflammatorische Zytokine wie TNF α freisetzen. TNF α kann verschiedenste Mechanismen zur Einleitung der Apoptose in Hepatozyten induzieren, was Leberschäden zur Folge hat (Zhang, Zhu et al. 2003). TNF α ist das entscheidende Zytokin in einer durch Ischämie/Reperfusion geschädigten Leber, da nach Transplantation dessen Produktion ansteigt, was wiederum den hepatischen Zelltod bzw. die Nekrosenbildung triggert (Ben-Ari,

Hochhauser et al. 2002). Wie bereits in Studien dargestellt, läuft die Erhöhung der TNF α -Spiegel charakteristischerweise in zwei Phasen ab (Lieber, He et al. 1997): Der erste Peak tritt kurz nach der Gabe von Adenoviren, etwa nach 3 Stunden auf, was mit einer Kupfferzell-Aktivierung korrespondiert. Der zweite Anstieg zeigt sich bei 36 Stunden während der Bindung und Internalisation der adenoviralen Partikel (Gossen and Bujard 1992). Unter den vielen zur Apoptose führenden Signalwegen erscheint TNF α v.a. auch für den mitochondrialen Weg von großer Bedeutung zu sein, der von Proteinen der bcl-2-Familie reguliert wird. An dieser Stelle gilt es therapeutisch einzugreifen, um die bcl-2-Spiegel in Hepatozyten zu erhöhen. Damit wurde Apoptose vermindert und die Leberzellen letztendlich geschützt.

Nach der Infektion des Immunsystems mit Adenoviren muss der Organismus den Virus schnellstmöglich erkennen, daraufhin dessen Vermehrung limitieren und schließlich alle Virus-infizierten Zellen beseitigen. In der Studie von Liu wurde nachgewiesen, dass als erste Form der Abwehr innerhalb von 24 h das angeborene Immunsystem aktiv wird (Liu and Muruve 2003). In dem infizierten Gewebe sind während dieser Zeit Neutrophile, natürliche Killerzellen und Makrophagen nachweisbar (Liu and Muruve 2003). Therapeutisch auch interessant ist die Wirkung von Kupffer-Zellen, die sehr effizient virale Vektoren, proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie das TNF α aufnehmen und in den Organismus abgeben (Canbay, Feldstein et al. 2003).

In diesem System wurden die Lebern 48 Stunden nach der Infektion mit Adenoviren transplantiert und deren TNF α -Spiegel jeweils 24 Stunden und 7 Tage nach Transplantation gemessen. Wie erwartet fielen die Level nach Infektion mit dem ‚leeren‘ Adenovirus signifikant höher aus verglichen mit in den nur mit Doxycyclin behandelten Kontrollen. Jedoch konnte kaum TNF α -mRNA in TetOn bcl2-Ad5/ rt-TA behandelten Lebern gefunden werden. TNF α wird von Monozyten, Makrophagen, Kupfferzellen, T- und B-Zellen (Liu and Muruve 2003) produziert, jedoch gilt das nicht für Hepatozyten oder Endothelzellen. In Makrophagen-Zelllinien ist eine TNF α -Expression, die mittels adenoviraler Vektoren induziert wird, mit der Internalisation des Vektors assoziiert. Der 3-Stunden-Peak repräsentierte das Freiwerden von TNF α als Ergebnis der Aktivität von Kupfferzellen. Dies geschieht während der Bindung und Internalisierung von adenoviralen Partikeln, die in unserem System im Empfänger hätten beobachtet werden müssen. Der 36-Stunden-TNF α -Peak dagegen korreliert mit dem Beginn einer frühen viralen Genexpression.

Dieser Mechanismus erscheint unwahrscheinlich, da in diesem System E1-deletierte adenovirale Konstrukte mit aufgehobener Replikation und einer frühen Genexpression verwendet wurden. Die adenoviralen Konstrukte infizieren kaum merklich das Monozyten-/Makrophagen-/Kupfferzell-/T-Zell- und B-Zell-System (Kiuchi, Schlitt et al. 1997), wodurch die Differenz von TNF α -Induktion in diesem Experiment eine Konsequenz der bcl-2-Expression in den Hepatozyten und/oder Endothelzellen ist bzw. konsekutiv eine Reduktion der Zahl apoptotischer Zellen im Transplantat bewirkt.

Zusätzlich blieb in den Experimenten die Zahl der Immunzellen nach Transplantation unbeeinflusst erhalten, ungeachtet der Art der Vorbehandlung (Jooss and Chirmule 2003). Daher könnte die geringere TNF α -Expression nach einem bcl-2-Transfer die Konsequenz einer Modulation des Ischämie-/Reperfusionsschadens durch Apoptosehemmung in Endothelzellen und Hepatozyten sein. Infolge eines Organschadens durch Ischämie und Reperfusion nach einer Lebertransplantation bedarf es zur Regeneration des Transplantats eines vollkommen intakten hepatischen Regenerationsprozesses. Eine TNF α -Hochregulierung nach Leberschaden wurde als einer der zwingend notwendigen Mechanismen für die Induktion einer Regeneration gezeigt (He, Zhou et al. 1998). Zusätzlich spiegelt diese hohe TNF α -Expression in den Versuchen nach Aufarbeitung des Transplantats mit Kontroll Ad5 einen endogenen Stimulus für eine Regeneration wider, der in verschiedenen durch Ischämie und Reperfusion geschädigten Lebertransplantaten Verwendung findet. Diese Tatsache wird durch den Grad der Apoptose im Vergleich zu anderen Gruppen bestätigt.

Die Beseitigung von apoptotischen Zell-Remnants in geschädigtem Gewebe wird durch dentritische Zellen und Makrophagen vermittelt (Albert, Pearce et al. 1998; Canbay, Feldstein et al. 2003; Lucas, Stuart et al. 2003). Als Folge kann die Entfernung apoptotischer Zellen möglicherweise die von Makrophagen gerichtete Deletion von adenovial-infizierten Zellen modulieren, Entzündungen unterdrücken und kritische Immunantworten regulieren (Graham, Smiley et al. 1977; Molin, Shoshan et al. 1998; Maulik, Sasaki et al. 1999). Auch unterdrückt die Aufnahme apoptotischer Restkörper möglicherweise die Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren wie zum Beispiel TNF α , welches von Makrophagen aktiviert wird (Albert, Pearce et al. 1998). In unserem Modell korrelieren die TNF α -Level mit dem Grad der Apoptose in den transplantierten Lebern, welche nach adenoviralem bcl-2-Transfer

deutlich vermindert waren. Von adenoviralen Vektoren ist bekannt, dass sie das Immunsystem des Empfängers stimulieren. Die antivirale Immunantwort tritt 5 bis 7 Tage nach der Transduktion auf und wird gegen die residuale Expression von viralen Genen gerichtet, die immer noch in der ersten Generation der rekombinanten Adenoviren vorhanden ist (Gao, Lemasters et al. 1993).

Letztendlich wurde in diesem Versuch gezeigt, dass neben dem Effekt einer deutlich geschwächten TNF α -Expression, keine signifikanten immunologischen Konsequenzen durch einen adenoviralen Gentransfer bei der Lebertransplantation induziert werden. Nach Transplantation lösten Ischämie und Reperfusion frühe Immunprozesse aus. Diese Immunantwort macht möglicherweise noch vor der Transplantation die Wirkung eines adenoviralen Gentransfers zunichte. Demnach kommen wir zu der Annahme, dass der adenovirale Transfer von bcl-2 in Lebergewebe einen viel versprechenden Weg zur Reduktion von Ischämie und Reperfusion ohne Provokation einer immun-getriggerten Entzündungsreaktion im Gewebe repräsentiert.

4. Positiver immunhistochemischer Nachweis einer geringeren Immunantwort in mit bcl-2 behandeltem Rattenlebergewebe

Die immunhistochemischen Laborarbeiten wiesen unter Verwendung der Strep-ABC-Methode die Bindung verabreichter Antikörper (CD4, CD8, CD45RA) an die entsprechenden Antigene in den mit bcl-2-behandelten Lebergeweben nach. Unsere Hypothese, dass ein adenoviral-vermittelter Transfer von bcl-2 in Ratten-Hepatozyten zu einer verminderten Immunantwort und damit zu einer geringeren Bildung von Immunzellen führt, wurde damit bestätigt. Diese Aussage stützt sich auf die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Auswertungen im Vergleich zu Gewebeschnitten von Kontrolltieren, die keiner bcl-2-Transfektion unterzogen wurden. Von insgesamt 110 Versuchstieren wurde eine Auswahl (Nr. 0, 12, 13, 14, 18, 22, 26, 27, 32, 37, 42, 47, 52, 57, 62, 67, 68, 72, 89, 93, 104) für die Versuche verwendet.

Ziel dieser Untersuchungen war es, den Beweis einer verminderten Immunreaktion in transplantierten Leberzellen von Ratten in Abhängigkeit der bcl-2-Expression zu erbringen. Dabei wurden Präparate einmal aus Lebern gewonnen, die den Versuchstieren 24 Stunden nach Transplantation entnommen wurden. Auf der

anderen Seite erfolgte für den Nachweis eines möglicherweise veränderten Immunstatus die Auswertung an Organen, die erst nach 7 Tagen explantiert wurden. Somit waren diese mit bcl-2-behandelten Spenderlebern nach Transplantation dem Empfängerorganismus und dessen Immunsystem längere Zeit ausgesetzt.

Die Gewebeschnitte von den Organen der Laborratten der Versuchsgruppe 5, die einen bcl-2-Transfer erhielten und 24 Stunden nach Transplantation dem Empfängertier entnommen wurden, zeigten im Versuch mit dem CD8- sowie dem CD45RA-Antikörper äußerst wenige gefärbte Zellen im lichtmikroskopischen Bild, was unsere Annahme der supprimierten Immunantwort nach bcl-2-Transfer bestätigt. Im Gegensatz dazu fiel die Färbung nach Verabreichung des CD4-Antikörpers stärker aus. Anderen Studien zu Folge gilt eigentlich eine geringere CD4-Expression nach Transplantation nachzuweisen, wobei dort der verminderte CD4-Anteil u.a. mit einer immunsuppressiven Therapie assoziiert wird (Demirkiran, Kok et al. 2005; Demirkiran, Kok et al. 2006). Andererseits ist eine v.a. in der Frühphase der Immunantwort erhöhte CD4-Expression im Vergleich zu CD8 und CD45RA belegt. Denn erst nachdem von CD4-Lymphozyten Zytokine ausgeschüttet wurden, werden in der Folge weitere Zellgruppen wie Makrophagen, CD8- Lymphozyten oder NK-Zellen aktiviert bzw. rekrutiert (Walsh, Strom et al. 2004). Dies beweist eine anfänglich vermehrte Anzahl von CD4-Zellen, was sich in unserem Versuch möglicherweise durch die vermehrte Färbung widerspiegelt. Unsere Forderungen nach einer Verminderung der Immunantwort nach Transplantation unter dem Einfluss von bcl-2 werden ebenfalls durch die Tatsache gestützt, dass in der Versuchsgruppe 4, die mit dem leeren Adenovirus infiziert wurde v.a. im Falle von CD4- und CD8-Zellen deutlich gefärbte Zellen nachzuweisen waren. Um die Immunantwort nach Transplantation auch im Verlauf beurteilen zu können, wurden den Empfängertieren der Versuchsgruppe 3 die Organe erst nach 7 Tagen entnommen und deren Schnittpräparate lichtmikroskopisch beurteilt. Wie zu erwarten waren unter dem Einfluss eines stattgefundenen bcl-2-Transfers die Immunzellen im Lebergewebe immer noch nicht vermehrt, was deutlich auf die Akzeptanz des Spenderorgans hinweist. Selbst die in der Frühphase der Immunantwort noch vermehrt nachgewiesenen CD4-Zellen waren nach 7 Tagen in ihrer Anzahl vermindert. CD8-Lymphozyten waren analog der Literatur durch die Aktivierung mittels früher CD4-Zellen in den Schnitten von 7 Tagen nach Transplantation im Vergleich zu den schon nach 24 Stunden entnommenen Präparaten angereichert (Walsh, Strom et al. 2004).

Die Schnitte mit dem Antikörper CD45RA, der als Oberflächenmarker sowohl auf CD4- als auch CD8-Zellen exprimiert wird (Cossarizza, Ortolani et al. 1996), wurden wie schon in der Auswertung der Versuchsreihe 24 Stunden nach Transplantatentnahme vermutet mit äußerst wenig angefärbten Zellen und folglich einer geringen Immunantwort dargestellt. Diese immunhistologischen Auswertungen standen am Ende aller Versuchsreihen und bestätigten nochmals die Hypothese einer verminderten Immunantwort in transplantierten Lebergeweben nach adenoviralem bcl-2-Transfer.

F. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit haben wir gezeigt, in welchem Maße die Immunreaktion nach Lebertransplantation durch adenoviralen bcl-2-Transfer in die Hepatozyten des Spenderorgans moduliert werden kann.

Durch Ischämie und Reperfusion während und nach der Transplantation werden immunologische Prozesse ausgelöst, zu denen die Freisetzung von schädigenden Zytokinen, Sauerstoffradikalen und Mediatoren gehört. In der Folge kann dies zu einem apoptotischen Zelluntergang führen. Die Funktion des transplantierten Organs kann so deutlich herabgesetzt werden, bis hin zu vollständiger Abstoßung und Organversagen (Puellmann, Beham et al. 2006).

So stellten wir in dieser Studie die Hypothese auf, dass durch Beeinflussung der Immunantwort und durch gezielte selektive Inhibition der Apoptose das Überleben des Transplantats verbessert werden kann. Dabei stellte ein selektiver zielgerichteter adenoviraler Transfer des anti-apoptotisch wirkenden Proteins bcl-2 einen intelligenten Weg dar, um eine Reduktion des Ischämie-/Reperfusionssschadens und eine Verminderung immunogetriggter Schäden in Lebergeweben zu kombinieren.

Je nach Applikation des bcl-2 Virus oder ‚leeren‘ Kontrollvirus Ad5 über die Vena jugularis wurden im Rattenversuch 8 Gruppen unterschieden, welchen nach 24 Stunden das Organ entnommen wurde und nach weiteren 16 Stunden kalter Ischämie dem Empfänger implantiert wurde. Zur Auswertung erfolgte die Explantation der Lebern nach weiteren 24 Stunden bzw. 7 Tagen, wobei in den mit bcl-2 behandelten Organen eine deutlich geringere Apoptoserate nachgewiesen werden konnte. Damit konnten wir beweisen, dass die Infektion der Spenderleber mit bcl-2 Ad5 nach der Implantation in einen neuen Organismus das Organ vor einem überschießenden Zelltod schützt.

In weiteren Versuchsreihen erfolgte eine Untersuchung angefertigter Leberschnitte der transplantierten Organe hinsichtlich ihrer immunhistochemischen Reaktionen in Abhängigkeit der adenoviralen Infektion. Der Nachweis eines erfolgreichen bcl-2 Gentransfers und von hepatischen Molekular-Markern gelang mittels PCR. Zusätzlich erbrachte eine deutlich verminderte TNF α - Expression in bcl-2 behandelten Lebern den Beweis für eine verminderte Apoptoserate nach Behandlung mit bcl-2 im Vergleich zum Kontrolladenovirus. Zur Darstellung des *in vitro* erfolgten Gentransfers diente die Western-Blot Analyse. Dabei wurde klar, dass eine bcl-2 Expression durch

Plasmid-Internalisierung und Vektor-Transfer im AdEasy-System nach Vogelstein nur in Anwesenheit von Doxycyclin erfolgte. Die abschließendene Immunhistochemie veranschaulichte das Färbeverhalten von Lymphozyten in Abhängigkeit von verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Reduktion bzw. das Fehlen gefärbter Zellen in den Gewebeschnitten machte die deutliche Immunmodulation durch Infektion mit bcl-2 deutlich.

Obwohl unser Modell der Behandlung und Infektion von Spenderorganen vor Explantation im klinischen Alltag noch nicht praktikabel ist, könnte der adenoviral induzierte bcl-2 Transfer ein therapeutisches Konzept von hoher Relevanz darstellen, welches apoptotischen Zelltod vermindert und die immunologische Reaktion moduliert. Dadurch könnte in der Zukunft die Organfunktion nach Transplantation deutlich verbessert werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1984). "The molecular biology of adenoviruses 3. 30 Years of adenovirus research 1953-1983." *Curr Top Microbiol Immunol* **111**: 1-110.
- Acuto, O. and E. L. Reinherz (1985). "The human T-cell receptor. Structure and function." *N Engl J Med* **312**(17): 1100-11.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **188**(7): 1359-68.
- Allison, J. P., L. Ridge, et al. (1984). "The murine T cell antigen receptor and associated structures." *Immunol Rev* **81**: 145-60.
- Anaya-Prado, R., L. H. Toledo-Pereyra, et al. (2002). "Ischemia/reperfusion injury." *J Surg Res* **105**(2): 248-58.
- Bae, J., J. A. Martinson, et al. (2005). "Identification of CD19 and CD20 peptides for induction of antigen-specific CTLs against B-cell malignancies." *Clin Cancer Res* **11**(4): 1629-38.
- Baumann, M., E. Bender, et al. (1989). "Effects of warm and cold ischemia on mitochondrial functions in brain, liver and kidney." *Mol Cell Biochem* **87**(2): 137-45.
- Belknap, J. K., S. Giguere, et al. (2007). "Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response." *Equine Vet J* **39**(1): 42-7.
- Belzer, F. O. and J. H. Southard (1988). "Principles of solid-organ preservation by cold storage." *Transplantation* **45**(4): 673-6.
- Ben-Ari, Z., E. Hochhauser, et al. (2002). "Role of anti-tumor necrosis factor-alpha in ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver in a blood-free environment." *Transplantation* **73**(12): 1875-80.
- Benichou, J., C. G. Halgrimson, et al. (1977). "Canine and human liver preservation for 6 to 18 hr by cold infusion." *Transplantation* **24**(6): 407-11.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, et al. (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." *Science* **275**(5304): 1320-3.
- Bett, A. J., L. Prevec, et al. (1993). "Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors." *J Virol* **67**(10): 5911-21.
- Bilbao, G., J. L. Contreras, et al. (1999). "Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene." *Ann Surg* **230**(2): 185-93.
- Birnbaum, M. J., R. J. Clem, et al. (1994). "An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs." *J Virol* **68**(4): 2521-8.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, et al. (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." *Annu Rev Immunol* **17**: 189-220.
- Boneca, I. G., O. Dussurget, et al. (2007). "From the Cover: A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in Listeria evasion from the host innate immune system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(3): 997-1002.
- Boulanger, P. A. and G. E. Blair (1991). "Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins." *Biochem J* **275** (Pt 2): 281-99.
- Bouwens, L., P. De Bleser, et al. (1992). "Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells." *Enzyme* **46**(1-3): 155-68.
- Brade, V. (1980). "[Mediators of inflammation and of antimicrobial activity secreted by macrophages (author's transl)]." *Zentralbl Bakteriol A* **247**(2): 259-75.
- Brennan, C. A., J. R. Delaney, et al. (2007). "Psidin is required in *Drosophila* blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body." *Curr Biol* **17**(1): 67-72.
- Burnett, R. M. (1985). "The structure of the adenovirus capsid. II. The packing symmetry of hexon and its implications for viral architecture." *J Mol Biol* **185**(1): 125-43.
- Burroughs, K. D., D. B. Kayda, et al. (2004). "Potentiation of oncolytic adenoviral vector efficacy with gutless vectors encoding GMCSF or TRAIL." *Cancer Gene Ther* **11**(2): 92-102.
- Caldwell-Kenkel, J. C., R. T. Currin, et al. (1991). "Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion." *Hepatology* **13**(1): 83-95.
- Callan, M. F., L. Tan, et al. (1998). "Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*." *J Exp Med* **187**(9): 1395-402.
- Calne, R. Y., D. J. White, et al. (1978). "Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors." *Lancet* **2**(8104-5): 1323-7.

- Calne, R. Y. and R. Williams (1968). "Liver transplantation in man. I. Observations on technique and organization in five cases." *Br Med J* **4**(5630): 535-40.
- Calne, R. Y. and R. Williams (1977). "Orthotopic liver transplantation: the first 60 patients." *Br Med J* **1**(6059): 471-6.
- Calne, R. Y., R. Williams, et al. (1968). "Liver transplantation in man. II. A report of two orthotopic liver transplants in adult recipients." *Br Med J* **4**(5630): 541-6.
- Canbay, A., A. E. Feldstein, et al. (2003). "Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression." *Hepatology* **38**(5): 1188-98.
- Canu, N. and P. Calissano (2003). "In vitro cultured neurons for molecular studies correlating apoptosis with events related to Alzheimer disease." *Cerebellum* **2**(4): 270-8.
- Carithers, R. L., Jr. (2000). "Liver transplantation. American Association for the Study of Liver Diseases." *Liver Transpl* **6**(1): 122-35.
- Carlos, T. M. and J. M. Harlan (1994). "Leukocyte-endothelial adhesion molecules." *Blood* **84**(7): 2068-101.
- Chao, D. T. and S. J. Korsmeyer (1998). "BCL-2 family: regulators of cell death." *Annu Rev Immunol* **16**: 395-419.
- Charbonneau, H., N. K. Tonks, et al. (1988). "The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(19): 7182-6.
- Chen, X., L. J. Ko, et al. (1996). "p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells." *Genes Dev* **10**(19): 2438-51.
- Choisy-Rossi, C., P. Reisdorf, et al. (1998). "Mechanisms of p53-induced apoptosis: in search of genes which are regulated during p53-mediated cell death." *Toxicol Lett* **102-103**: 491-6.
- Chroboczek, J., F. Bieber, et al. (1992). "The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2." *Virology* **186**(1): 280-5.
- Cisneros, C., F. Guillen, et al. (1991). "Analysis of warm ischemia time for prediction of primary nonfunction of the hepatic graft." *Transplant Proc* **23**(3): 1976.
- Clavien, P. A., P. R. Harvey, et al. (1992). "Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies." *Transplantation* **53**(5): 957-78.
- Cossarizza, A., C. Ortolani, et al. (1996). "CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory." *Mech Ageing Dev* **86**(3): 173-95.
- Crook, N. E., R. J. Clem, et al. (1993). "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif." *J Virol* **67**(4): 2168-74.
- D'Alessandro, A. M., M. Kalayoglu, et al. (1990). "Experience with Belzer UW cold storage solution in human liver transplantation." *Transplant Proc* **22**(2): 474-6.
- Dabareiner, R. M., N. A. White, et al. (2005). "Effects of Carolina rinse solution, dimethyl sulfoxide, and the 21-aminosteroid, U-74389G, on microvascular permeability and morphology of the equine jejunum after low-flow ischemia and reperfusion." *Am J Vet Res* **66**(3): 525-36.
- Davies, P. and A. C. Allison (1976). "The macrophage as a secretory cell in chronic inflammation." *Agents Actions* **6**(1-3): 60-74.
- Davies, P., R. J. Bonney, et al. (1980). "The role of macrophage secretory products in chronic inflammatory processes." *J Invest Dermatol* **74**(5): 292-6.
- Davison, A. J., M. Benko, et al. (2003). "Genetic content and evolution of adenoviruses." *J Gen Virol* **84**(Pt 11): 2895-908.
- Decker, K. (1990). "Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells)." *Eur J Biochem* **192**(2): 245-61.
- Delneste, Y., C. Beauvillain, et al. (2007). "[Innate immunity: structure and function of TLRs]." *Med Sci (Paris)* **23**(1): 67-74.
- Delva, E., Y. Camus, et al. (1989). "Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases." *Ann Surg* **209**(2): 211-8.
- Demirkiran, A., A. Kok, et al. (2006). "Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation." *Liver Transpl* **12**(2): 277-84.
- Demirkiran, A., A. Kok, et al. (2005). "Decrease of CD4+CD25+ T cells in peripheral blood after liver transplantation: association with immunosuppression." *Transplant Proc* **37**(2): 1194-6.
- Diaz Padilla, N., W. K. Bleeker, et al. (2003). "Rat C-reactive protein activates the autologous complement system." *Immunology* **109**(4): 564-71.
- Douagi, I., G. M. McInerney, et al. (2007). "Role of IRF-3 in Type I IFN Responses in Rotavirus Infected Dendritic cells and Fibroblasts." *J Virol*.
- Dudziak, D., A. O. Kamphorst, et al. (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." *Science* **315**(5808): 107-11.
- Earnshaw, W. C. (1995). "Nuclear changes in apoptosis." *Curr Opin Cell Biol* **7**(3): 337-43.

- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al. (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
- Esser, A. F. (1994). "The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity." *Toxicology* **87**(1-3): 229-47.
- Fabry, C. M., M. Rosa-Calatrava, et al. (2005). "A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid." *Embo J* **24**(9): 1645-54.
- Fagone, P., R. Sriburi, et al. (2007). "Phospholipid biosynthesis program underlying membrane expansion during B-lymphocyte differentiation." *J Biol Chem*.
- Fan, C., R. M. Zwacka, et al. (1999). "Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver." *J Mol Med* **77**(8): 577-92.
- Fassett, M. S., D. M. Davis, et al. (2001). "Signaling at the inhibitory natural killer cell immune synapse regulates lipid raft polarization but not class I MHC clustering." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14547-52.
- Fechner, H., A. Haack, et al. (1999). "Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers." *Gene Ther* **6**(9): 1520-35.
- Fernandez-Varon, E. and L. Villamayor (2006). "Granulocyte and granulocyte macrophage colony-stimulating factors as therapy in human and veterinary medicine." *Vet J*.
- Fu, M., P. S. Fan, et al. (2006). "Identification of poly-reactive natural IgM antibody that recognizes late apoptotic cells and promotes phagocytosis of the cells." *Apoptosis*.
- furth, P. A., A. Shamay, et al. (1992). "Gene transfer into somatic tissues by jet injection." *Anal Biochem* **205**(2): 365-8.
- Furth, P. A., L. St Onge, et al. (1994). "Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9302-6.
- Gao, W., J. J. Lemasters, et al. (1993). "Development of a new method for hepatic rearterialization in rat orthotopic liver transplantation. Reduction of liver injury and improvement of surgical outcome by arterialization." *Transplantation* **56**(1): 19-24.
- Garwicz, D., J. Palmblad, et al. (2006). "Normal levels of constitutive and death receptor-mediated apoptosis of peripheral blood neutrophils from patients with chronic idiopathic neutropenia." *Clin Immunol*.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman, et al. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." *J Cell Biol* **119**(3): 493-501.
- Ghosh, P. C. and B. K. Bachhawat (1991). "Targeting of liposomes to hepatocytes." *Targeted Diagn Ther* **4**: 87-103.
- Gill, P. S., G. G. Krueger, et al. (2002). "Doxycycline-inducible retroviral expression of green fluorescent protein in immortalized human keratinocytes." *Exp Dermatol* **11**(3): 266-74.
- Gollackner, B., R. Sedivy, et al. (2000). "Increased apoptosis of hepatocytes in vascular occlusion after orthotopic liver transplantation." *Transpl Int* **13**(1): 49-53.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5547-51.
- Gossen, M., S. Freundlieb, et al. (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." *Science* **268**(5218): 1766-9.
- Graham, F. L. and L. Prevec (1992). "Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines." *Biotechnology* **20**: 363-90.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Granger, D. N. (1988). "Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury." *Am J Physiol* **255**(6 Pt 2): H1269-75.
- Granucci, F., S. Feau, et al. (2003). "The immune response is initiated by dendritic cells via interaction with microorganisms and interleukin-2 production." *J Infect Dis* **187 Suppl 2**: S346-50.
- Greber, U. F., M. Suomalainen, et al. (1997). "The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry." *Embo J* **16**(19): 5998-6007.
- Gross, A., J. M. McDonnell, et al. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* **13**(15): 1899-911.
- Gujral, J. S., T. J. Bucci, et al. (2001). "Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis?" *Hepatology* **33**(2): 397-405.
- Gullo, A. and G. Berlot (1996). "Ingredients of organ dysfunction or failure." *World J Surg* **20**(4): 430-6.
- Gunzburg, W. H. and B. Salmons (1996). "Development of retroviral vectors as safe, targeted gene delivery systems." *J Mol Med* **74**(4): 171-82.
- Gutgemann, A., T. S. Lie, et al. (1975). "[Current problems of liver transplantation. Recent experiences in six liver transplantations]." *Dtsch Med Wochenschr* **100**(40): 2047-52.

- Gutgemann, A., K. H. Schriefers, et al. (1969). "A case of homologous liver transplantation." *Ger Med Mon* **14**(11): 525-8.
- Ha, S. A., M. Tsuji, et al. (2006). "Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors." *J Exp Med* **203**(11): 2541-50.
- Hallek, M., H. Buening, et al. (2001). "[Basis of gene therapy: principles and state of development]." *Internist (Berl)* **42**(10): 1306-8, 1311-3.
- Harvey, P. R., S. Iu, et al. (1988). "Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia." *Transplantation* **45**(6): 1016-20.
- He, T. C., S. Zhou, et al. (1998). "A simplified system for generating recombinant adenoviruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2509-14.
- Hearing, P., R. J. Samulski, et al. (1987). "Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome." *J Virol* **61**(8): 2555-8.
- Hernandez, L. A., M. B. Grisham, et al. (1987). "Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury." *Am J Physiol* **253**(3 Pt 2): H699-703.
- Hoebeka, I., M. De Smedt, et al. (2006). "T-, B- and NK-lymphoid, but not myeloid cells arise from human CD34(+)CD38(-)CD7(+) common lymphoid progenitors expressing lymphoid-specific genes." *Leukemia*.
- Howard, T. K., G. B. Klintmalm, et al. (1990). "The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient." *Transplantation* **49**(1): 103-7.
- Huang, D. C., L. A. O'Reilly, et al. (1997). "The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry." *Embo J* **16**(15): 4628-38.
- Husted, T. L. and A. B. Lentsch (2006). "The role of cytokines in pharmacological modulation of hepatic ischemia/reperfusion injury." *Curr Pharm Des* **12**(23): 2867-73.
- Huynh, K. K., E. L. Eskelinen, et al. (2007). "LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes." *Embo J* **26**(2): 313-24.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." *Nat Rev Cancer* **2**(4): 277-88.
- Jaeschke, H. (1996). "Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences." *J Hepatol* **25**(5): 774-80.
- Jaeschke, H. (1998). "Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver." *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **5**(4): 402-8.
- Jaeschke, H., A. P. Bautista, et al. (1991). "Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia." *Free Radic Res Commun* **15**(5): 277-84.
- Jaeschke, H. and A. Farhood (1991). "Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver." *Am J Physiol* **260**(3 Pt 1): G355-62.
- Jaeschke, H., A. Farhood, et al. (1993). "Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia." *Am J Physiol* **264**(4 Pt 1): G801-9.
- Jaeschke, H., A. Farhood, et al. (1993). "Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver." *Hepatology* **17**(5): 915-23.
- Jaeschke, H. and T. Hasegawa (2006). "Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury." *Liver Int* **26**(8): 912-9.
- Janeway, C. A., A. V. Chervonsky, et al. (1997). "T-cell receptors: is the repertoire inherently MHC-specific?" *Curr Biol* **7**(5): R299-300.
- Jolly, D. (1994). "Viral vector systems for gene therapy." *Cancer Gene Ther* **1**(1): 51-64.
- Jooss, K. and N. Chirmule (2003). "Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy." *Gene Ther* **10**(11): 955-63.
- Kam, P. C. and N. I. Ferch (2000). "Apoptosis: mechanisms and clinical implications." *Anaesthesia* **55**(11): 1081-93.
- Kamada, N. and R. Y. Calne (1983). "A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat." *Surgery* **93**(1 Pt 1): 64-9.
- Kamath, P. S. and W. R. Kim (2007). "The model for end-stage liver disease (MELD)." *Hepatology* **45**(3): 797-805.
- Kamath, P. S., R. H. Wiesner, et al. (2001). "A model to predict survival in patients with end-stage liver disease." *Hepatology* **33**(2): 464-70.
- Kamiike, W., M. Burdelski, et al. (1988). "Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation." *Transplantation* **45**(1): 138-43.
- Kass-Eisler, A., E. Falck-Pedersen, et al. (1994). "The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer." *Gene Ther* **1**(6): 395-402.

- Kataoka, S. and T. Tsuruo (1996). "Physician Education: Apoptosis." *Oncologist* **1**(6): 399-401.
- Ke, B., G. S. Lipshutz, et al. (2006). "Gene therapy in liver ischemia and reperfusion injury." *Curr Pharm Des* **12**(23): 2969-75.
- Kearney, J. F. (2005). "Innate-like B cells." *Springer Semin Immunopathol* **26**(4): 377-83.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-57.
- Kerr, M. A. (1980). "The human complement system: assembly of the classical pathway C3 convertase." *Biochem J* **189**(1): 173-81.
- Kiess, W. and B. Gallaher (1998). "Hormonal control of programmed cell death/apoptosis." *Eur J Endocrinol* **138**(5): 482-91.
- Kiuchi, T., H. J. Schlitt, et al. (1997). "Early acute rejection after hepatic graft reperfusion: association with ischemic injury with good function, oxygenation heterogeneity, and leukocyte adhesion without aggregation." *Transplant Proc* **29**(1-2): 364-5.
- Knolle, P. A. and G. Gerken (2000). "Local control of the immune response in the liver." *Immunol Rev* **174**: 21-34.
- Knott, A., L. Druoppel, et al. (2005). "An optimized conditional suicide switch using doxycycline-dependent expression of human tBid." *Cancer Biol Ther* **4**(5): 532-6.
- Kohler, B. (2006). "Mathematically modeling dynamics of T cell responses: Predictions concerning the generation of memory cells." *J Theor Biol*.
- Koretzky, G. A., J. Picus, et al. (1991). "Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6): 2037-41.
- Koretzky, G. A., J. Picus, et al. (1990). "Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway." *Nature* **346**(6279): 66-8.
- Korsnes, M. S., D. L. Hetland, et al. (2006). "Induction of apoptosis by YTX in myoblast cell lines via mitochondrial signalling transduction pathway." *Toxicol In Vitro* **20**(8): 1419-26.
- Kreppel, F. and S. Kochanek (2004). "Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors." *J Virol* **78**(1): 9-22.
- Kroemer, G. and S. J. Martin (2005). "Caspase-independent cell death." *Nat Med* **11**(7): 725-30.
- Krom, R. A. (1986). "Liver transplantation at the Mayo Clinic." *Mayo Clin Proc* **61**(4): 278-82.
- Kuhnel, F., C. Fritsch, et al. (2004). "Doxycycline regulation in a single retroviral vector by an autoregulatory loop facilitates controlled gene expression in liver cells." *Nucleic Acids Res* **32**(3): e30.
- Kukan, M. and P. S. Haddad (2001). "Role of hepatocytes and bile duct cells in preservation-reperfusion injury of liver grafts." *Liver Transpl* **7**(5): 381-400.
- Kulkarni, S. and D. C. Cronin, 2nd (2006). "Ethics in liver transplantation." *Semin Liver Dis* **26**(3): 234-8.
- LaCasse, E. C., S. Baird, et al. (1998). "The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer." *Oncogene* **17**(25): 3247-59.
- Lee, J. A., R. S. Sinkovits, et al. (2006). "Components of the antigen processing and presentation pathway revealed by gene expression microarray analysis following B cell antigen receptor (BCR) stimulation." *BMC Bioinformatics* **7**: 237.
- Lieber, A., C. Y. He, et al. (1997). "The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors." *J Virol* **71**(11): 8798-807.
- Lim, Y. P., T. T. Lim, et al. (2006). "The p53 knowledgebase: an integrated information resource for p53 research." *Oncogene*.
- Liu, H., J. H. Naismith, et al. (2003). "Adenovirus DNA replication." *Curr Top Microbiol Immunol* **272**: 131-64.
- Liu, Q. and D. A. Muruve (2003). "Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors." *Gene Ther* **10**(11): 935-40.
- Lokshin, M., T. Tanaka, et al. (2005). "Transcriptional regulation by p53 and p73." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**: 121-8.
- Long, E. O. (1999). "Regulation of immune responses through inhibitory receptors." *Annu Rev Immunol* **17**: 875-904.
- Losada, I., V. Cuervas-Mons, et al. (2002). "[Early infection in liver transplant recipients: incidence, severity, risk factors and antibiotic sensitivity of bacterial isolates]." *Enferm Infect Microbiol Clin* **20**(9): 422-30.
- Lucas, M., L. M. Stuart, et al. (2003). "Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion." *J Immunol* **171**(5): 2610-5.

- Lumsden, J. H., V. E. Valli, et al. (1974). "The Piromen Test as an assay of bone marrow granulocyte reserves in the calf. I. Studies on bone marrow and peripheral blood leukocytes." *Can J Comp Med* **38**(1): 56-64.
- Macaulay, A. E., R. H. DeKruyff, et al. (1997). "Antigen-specific B cells preferentially induce CD4+ T cells to produce IL-4." *J Immunol* **158**(9): 4171-9.
- Madisch, I., R. Wolfel, et al. (2006). "Molecular identification of adenovirus sequences: a rapid scheme for early typing of human adenoviruses in diagnostic samples of immunocompetent and immunodeficient patients." *J Med Virol* **78**(9): 1210-7.
- Mahoney, J. A. and A. Rosen (2005). "Apoptosis and autoimmunity." *Curr Opin Immunol* **17**(6): 583-8.
- Makino, M., Y. Maeda, et al. (2006). "Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages." *Microbes Infect*.
- Markmann, J. F., J. Gornbein, et al. (1999). "A simple model to estimate survival after retransplantation of the liver." *Transplantation* **67**(3): 422-30.
- Martin, D. R., D. F. Scott, et al. (1972). "Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation: cold sensitivity of the ATPase system." *Ann Surg* **175**(1): 111-7.
- Marzi, I., F. Walcher, et al. (1993). "Macrophage activation and leukocyte adhesion after liver transplantation." *Am J Physiol* **265**(1 Pt 1): G172-7.
- Maulik, N., H. Sasaki, et al. (1999). "Differential regulation of apoptosis by ischemia-reperfusion and ischemic adaptation." *Ann N Y Acad Sci* **874**: 401-11.
- May, M. J. and S. Ghosh (1998). "Signal transduction through NF-kappa B." *Immunol Today* **19**(2): 80-8.
- Mayelzadeh, F. and J. D. Martinez (2006). "DNA binding and selective gene induction by different forms of the p53 protein." *Oncogene*.
- McCord, J. M. (1985). "Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury." *N Engl J Med* **312**(3): 159-63.
- McCord, J. M. (1987). "Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation." *Fed Proc* **46**(7): 2402-6.
- McCord, J. M. and R. S. Roy (1982). "The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia." *Can J Physiol Pharmacol* **60**(11): 1346-52.
- McKenna, D. H., Jr., D. Sumstad, et al. (2007). "Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six-year single-institution experience." *Transfusion* **47**(3): 520-8.
- Megiovanni, A. M., F. Sanchez, et al. (2006). "Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes." *J Leukoc Biol* **79**(5): 977-88.
- Menger, M. D., D. Steiner, et al. (1992). "Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow"." *Am J Physiol* **263**(6 Pt 2): H1892-900.
- Merrick, A. F., L. D. Shewring, et al. (1996). "Comparison of adenovirus gene transfer to vascular endothelial cells in cell culture, organ culture, and in vivo." *Transplantation* **62**(8): 1085-9.
- Meuer, S. C., R. E. Hussey, et al. (1982). "Surface structures involved in target recognition by human cytotoxic T lymphocytes." *Science* **218**(4571): 471-3.
- Michie, C. A., A. McLean, et al. (1992). "Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms." *Nature* **360**(6401): 264-5.
- Miller, A. D. and G. J. Rosman (1989). "Improved retroviral vectors for gene transfer and expression." *Biotechniques* **7**(9): 980-2, 984-6, 989-90.
- Molin, M., M. C. Shoshan, et al. (1998). "Two novel adenovirus vector systems permitting regulated protein expression in gene transfer experiments." *J Virol* **72**(10): 8358-61.
- Moore, M., N. Horikoshi, et al. (1996). "Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11295-301.
- Moretta, L. and A. Moretta (2004). "Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors." *Embo J* **23**(2): 255-9.
- Morimoto, T., K. Kusumoto, et al. (1991). "Impairment of grafts by short-term warm ischemia in rat liver transplantation." *Transplantation* **52**(3): 424-31.
- Munoz, L. E., S. Franz, et al. (2007). "The influence on the immunomodulatory effects of dying and dead cells of Annexin V." *J Leukoc Biol* **81**(1): 6-14.
- Naito, M., G. Hasegawa, et al. (2004). "Differentiation and function of Kupffer cells." *Med Electron Microsc* **37**(1): 16-28.
- Nasz, I. and E. Adam (2006). "Symmetry types, systems and their multiplicity in the structure of adenovirus capsid. I. Symmetry networks and general symmetry motifs." *Acta Microbiol Immunol Hung* **53**(1): 1-23.

- Nasz, I. and E. Adam (2006). "Symmetry types, systems and their multiplicity in the structure of adenovirus capsid. II. Rotational facet groups of five-, three- and two-fold symmetry axes." *Acta Microbiol Immunol Hung* **53**(2): 115-33.
- Nieuwenhuijs, V. B., M. T. De Bruijn, et al. (2006). "Hepatic ischemia-reperfusion injury: roles of Ca²⁺ and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage." *Dig Dis Sci* **51**(6): 1087-102.
- Nolan, J. P. (1981). "Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury." *Hepatology* **1**(5): 458-65.
- Norrby, E., A. Bartha, et al. (1976). "Adenoviridae." *Intervirology* **7**(3): 117-25.
- Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." *Cell* **74**(4): 609-19.
- Oshiro, T., M. Shiraishi, et al. (2002). "Adenovirus mediated gene transfer of antiapoptotic protein in hepatic ischemia-reperfusion injury: the paradoxical effect of Bcl-2 expression in the reperfused liver." *J Surg Res* **103**(1): 30-6.
- Page, A. R. and R. A. Good (1958). "A clinical and experimental study of the function of neutrophils in the inflammatory response." *Am J Pathol* **34**(4): 645-69.
- Penn, I. (1996). "Posttransplantation de novo tumors in liver allograft recipients." *Liver Transpl Surg* **2**(1): 52-9.
- Pickles, R. J., D. McCarty, et al. (1998). "Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer." *J Virol* **72**(7): 6014-23.
- Ploeg, R. J., A. M. D'Alessandro, et al. (1993). "Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis." *Transplantation* **55**(4): 807-13.
- Portnoy, B., J. Miller, et al. (2007). "Impact of the National Institutes of Health Consensus Development Program on stimulating National Institutes of Health-funded research, 1998 to 2001." *Int J Technol Assess Health Care* **23**(3): 343-8.
- Post, S. and K. Messmer (1996). "[The role of reperfusion damage]." *Chirurg* **67**(4): 318-23.
- Puellmann, K., A. Beham, et al. (2006). "Inhibition of apoptosis reduces immunogenic potential of adenoviral-treated syngeneic liver grafts." *Transplantation* **82**(10): 1377-82.
- Pugh, R. N., I. M. Murray-Lyon, et al. (1973). "Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices." *Br J Surg* **60**(8): 646-9.
- Puntel, M., J. F. Curtin, et al. (2006). "Quantification of high-capacity helper-dependent adenoviral vector genomes in vitro and in vivo, using quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction." *Hum Gene Ther* **17**(5): 531-44.
- Puttini, S., A. T. Beggah, et al. (2001). "Tetracycline-inducible gene expression in cultured rat renal CD cells and in intact CD from transgenic mice." *Am J Physiol Renal Physiol* **281**(6): F1164-72.
- Qin, X. Y., K. T. Shen, et al. (2002). "Establishment of an artificial beta-cell line expressing insulin under the control of doxycycline." *World J Gastroenterol* **8**(2): 367-70.
- Raison, J. K. (1973). "Temperature-induced phase changes in membrane lipids and their influence on metabolic regulation." *Symp Soc Exp Biol* **27**: 485-512.
- Rao, P., L. A. Falk, et al. (1997). "Colchicine down-regulates lipopolysaccharide-induced granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in murine macrophages." *J Immunol* **159**(7): 3531-9.
- Rauen, U., T. Noll, et al. (1994). "Endothelial cell toxicity of preservation solutions: comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state." *Cryobiology* **31**(2): 144-53.
- Rediske, J. J. and R. J. Pickering (1985). "Effect of prostaglandins on complement production by tissue macrophages." *J Leukoc Biol* **37**(5): 651-8.
- Reed, J. C. (1996). "Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease." *Behring Inst Mitt* **97**: 72-100.
- Rekhter, M. D., R. D. Simari, et al. (1998). "Gene transfer into normal and atherosclerotic human blood vessels." *Circ Res* **82**(12): 1243-52.
- Rekosh, D. M., W. C. Russell, et al. (1977). "Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA." *Cell* **11**(2): 283-95.
- Rentsch, M., A. Beham, et al. (2001). "Impact of prolonged cold ischemia and reperfusion on apoptosis, activation of caspase 3, and expression of bax after liver transplantation in the rat." *Transplant Proc* **33**(1-2): 850-1.
- Rentsch, M., K. Kienle, et al. (2005). "Adenoviral bcl-2 transfer improves survival and early graft function after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation." *Transplantation* **80**(10): 1461-7.
- Rentsch, M., K. Puellmann, et al. (2005). "Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival." *Transpl Int* **18**(9): 1079-89.

- Resnitzky, D., M. Gossen, et al. (1994). "Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1669-79.
- Robinson, A. J., H. B. Younghusband, et al. (1973). "A circula DNA-protein complex from adenoviruses." *Virology* **56**(1): 54-69.
- Roelvink, P. W., A. Lizonova, et al. (1998). "The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F." *J Virol* **72**(10): 7909-15.
- Romanque, U. P., M. M. Uribe, et al. (2005). "[Molecular mechanisms in liver ischemic-reperfusion injury and ischemic preconditioning]." *Rev Med Chil* **133**(4): 469-76.
- Rosen, H. R., J. P. Madden, et al. (1999). "A model to predict survival following liver retransplantation." *Hepatology* **29**(2): 365-70.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, et al. (1957). "Definition and outline of contemporary information on the adenovirus group." *Ann N Y Acad Sci* **67**(8): 255-61.
- Sacchetti, C., A. Ponassi, et al. (1971). "[Mechanisms of the regulation of granulocytopoiesis in humans. Modifications of the rhythm of the release of granulocytes from the bone marrow]." *Boll Soc Ital Biol Sper* **47**(19): 598-601.
- Saijo, S., K. Nagata, et al. (2006). "Discrimination of early and late apoptotic cells by NBD-phosphatidylserine-labeling and time-lapse observation of phagocytosis of apoptotic cells by macrophages." *J Biochem (Tokyo)*.
- Sandig, V. and M. Strauss (1996). "Liver-directed gene transfer and application to therapy." *J Mol Med* **74**(4): 205-12.
- Saraste, A. (1999). "Morphologic criteria and detection of apoptosis." *Herz* **24**(3): 189-95.
- Sargent, S. and S. P. Wainwright (2006). "Quality of life following emergency liver transplantation for acute liver failure." *Nurs Crit Care* **11**(4): 168-76.
- Sawada, Y., K. Raska, Jr., et al. (1988). "Adenovirus type 5 and adenovirus type 12 recombinant viruses containing heterologous E1 genes are viable, transform rat cells, but are not tumorigenic in rats." *Virology* **166**(1): 281-4.
- Schattenberg, J. M., P. R. Galle, et al. (2006). "Apoptosis in liver disease." *Liver Int* **26**(8): 904-11.
- Sen, S. (1992). "Programmed cell death: concept, mechanism and control." *Biol Rev Camb Philos Soc* **67**(3): 287-319.
- Sharif, O., V. N. Bolshakov, et al. (2007). "Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages." *BMC Immunol* **8**: 1.
- Shepard, R. N. and D. A. Ornelles (2004). "Diverse roles for E4orf3 at late times of infection revealed in an E1B 55-kilodalton protein mutant background." *J Virol* **78**(18): 9924-35.
- Shimizu, H., M. Miyazaki, et al. (2001). "Mechanism of cold ischemia-reperfusion-induced graft injury after orthotopic liver transplantation in rats." *Hepatogastroenterology* **48**(37): 216-9.
- Shrive, A. K., A. M. Metcalfe, et al. (1999). "C-reactive protein and SAP-like pentraxin are both present in Limulus polyphemus haemolymph: crystal structure of Limulus SAP." *J Mol Biol* **290**(5): 997-1008.
- Sieber, T. and T. Dobner (2007). "Adenovirus type 5 early region 1B 156R protein promotes cell transformation independently of repression of p53-stimulated transcription." *J Virol* **81**(1): 95-105.
- Singer, D. and H. J. Bretschneider (1990). "Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological problems and natural examples--Part 1." *Thorac Cardiovasc Surg* **38**(4): 205-11.
- Socha, P., J. Michalkiewicz, et al. (2001). "Deficiency of the expression of CD45RA isoform of CD45 common leukocyte antigen in CD4+ T lymphocytes in children with infantile cholestasis." *Immunol Lett* **75**(3): 179-84.
- Sorrentino, D., K. Van Ness, et al. (1991). "Functional and morphological features of isolated hepatocytes preserved in University of Wisconsin solution." *Hepatology* **14**(2): 331-9.
- Sprengel, J., B. Schmitz, et al. (1994). "Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: comparative functional analysis." *J Virol* **68**(1): 379-89.
- Starzl, T. E., S. Iwatsuki, et al. (1982). "Evolution of liver transplantation." *Hepatology* **2**(5): 614-36.
- Starzl, T. E., G. B. Klintmalm, et al. (1981). "Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone." *N Engl J Med* **305**(5): 266-9.
- Starzl, T. E., T. L. Marchioro, et al. (1965). "Experimental and clinical observations after homotransplantation of the whole liver." *Rev Int Hepatol* **15**(8): 1447-80.
- Starzl, T. E., T. L. Marchioro, et al. (1963). "Homotransplantation of the Liver in Humans." *Surg Gynecol Obstet* **117**: 659-76.
- Steller, H. (1995). "Mechanisms and genes of cellular suicide." *Science* **267**(5203): 1445-9.
- Stover, D. R. and K. A. Walsh (1994). "Protein-tyrosine phosphatase activity of CD45 is activated by sequential phosphorylation by two kinases." *Mol Cell Biol* **14**(8): 5523-32.

- Straatsburg, I. H., M. A. Boermeester, et al. (2000). "Complement activation induced by ischemia-reperfusion in humans: a study in patients undergoing partial hepatectomy." *J Hepatol* **32**(5): 783-91.
- Strano, S., S. Dell'orso, et al. (2006). "Mutant p53 proteins: Between loss and gain of function." *Head Neck*.
- Strasberg, S. M., T. K. Howard, et al. (1994). "Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation." *Hepatology* **20**(4 Pt 1): 829-38.
- Stratford-Perricaudet, L. D., M. Levrero, et al. (1990). "Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector." *Hum Gene Ther* **1**(3): 241-56.
- Sumimoto, R., N. V. Jamieson, et al. (1989). "24-hour rat liver preservation using UW solution and some simplified variants." *Transplantation* **48**(1): 1-5.
- Sun, J. Y., V. Anand-Jawa, et al. (2003). "Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors." *Gene Ther* **10**(11): 964-76.
- Sunyach, C., M. Alfa Cisse, et al. (2006). "The C-terminal products of cellular prion protein processing, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine-induced caspase-3 activation." *J Biol Chem*.
- Suresh, M. V., S. K. Singh, et al. (2006). "Role of the property of C-reactive protein to activate the classical pathway of complement in protecting mice from pneumococcal infection." *J Immunol* **176**(7): 4369-74.
- Tabatabaei-Zavareh, N., A. Vlasova, et al. (2007). "Characterization of developmental pathway of natural killer cells from embryonic stem cells in vitro." *PLoS ONE* **2**: e232.
- Takushi, Y., M. Shiraishi, et al. (2006). "Expression of anti-apoptotic protein, Bcl-2, in liver regeneration after a partial hepatectomy." *J Surg Res* **134**(1): 93-101.
- Tan, L. C., N. Gudgeon, et al. (1999). "A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers." *J Immunol* **162**(3): 1827-35.
- Thomas, C. E., A. Ehrhardt, et al. (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." *Nat Rev Genet* **4**(5): 346-58.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." *Science* **267**(5203): 1456-62.
- Tsujimoto, Y., L. R. Finger, et al. (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation." *Science* **226**(4678): 1097-9.
- Vajdova, K., S. Heinrich, et al. (2004). "Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury." *Liver Transpl* **10**(4): 520-8.
- Van Amersfoort, E. S., T. J. Van Berkel, et al. (2003). "Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock." *Clin Microbiol Rev* **16**(3): 379-414.
- van Oostrum, J. and R. M. Burnett (1985). "Molecular composition of the adenovirus type 2 virion." *J Virol* **56**(2): 439-48.
- Verhagen, A. M., T. K. Kratina, et al. (2006). "Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs." *Cell Death Differ*.
- Vugmeyster, Y., K. Howell, et al. (2004). "B-cell subsets in blood and lymphoid organs in Macaca fascicularis." *Cytometry A* **61**(1): 69-75.
- Walsh, P. T., T. B. Strom, et al. (2004). "Routes to transplant tolerance versus rejection; the role of cytokines." *Immunity* **20**(2): 121-31.
- Wang, J., W. Li, et al. (2004). "Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocytes modified by BCL-2 gene protects rats from acute liver failure." *Transplant Proc* **36**(10): 2924-6.
- Welch, C. S. (1955). "[Liver graft]." *Maroc Med* **34**(359): 514-5.
- Wernig, F. and Q. Xu (2002). "Mechanical stress-induced apoptosis in the cardiovascular system." *Prog Biophys Mol Biol* **78**(2-3): 105-37.
- Wiesner, R., E. Edwards, et al. (2003). "Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers." *Gastroenterology* **124**(1): 91-6.
- Wiesner, R. H., S. V. McDiarmid, et al. (2001). "MELD and PELD: application of survival models to liver allocation." *Liver Transpl* **7**(7): 567-80.
- Wolfson, J. and D. Dressler (1972). "Adenovirus-2 DNA contains an inverted terminal repetition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(10): 3054-7.
- Wu, G. Y. and C. H. Wu (1987). "Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system." *J Biol Chem* **262**(10): 4429-32.
- Wyllie, A. H. (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation." *Nature* **284**(5756): 555-6.

- Xiong, C., H. Hu, et al. (2000). "[Liver sinusoidal endothelial cell damage during normothermic ischemia and reperfusion of rat]." *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* **38**(4): 297-9, 17.
- Yamada, A., T. Kaneyuki, et al. (1992). "CD45 isoform expression on human neonatal T cells: expression and turnover of CD45 isoforms on neonatal versus adult T cells after activation." *Cell Immunol* **142**(1): 114-24.
- Yamamoto, S., E. Kuramoto, et al. (1988). "In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis BCG*." *Jpn J Cancer Res* **79**(7): 866-73.
- Yamamoto, T. (2006). "[Bacterial strategies for escaping the bactericidal mechanisms by macrophage]." *Yakugaku Zasshi* **126**(12): 1235-43.
- Yanagi, Y., Y. Yoshikai, et al. (1984). "A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains." *Nature* **308**(5955): 145-9.
- Ying, S., Q. Meng, et al. (2001). "Macrophage inflammatory protein-1alpha and C-C chemokine receptor-1 in allergen-induced skin late-phase reactions: relationship to macrophages, neutrophils, basophils, eosinophils and T lymphocytes." *Clin Exp Allergy* **31**(11): 1724-31.
- Yokoyama, W. M. (2005). "Natural killer cell immune responses." *Immunol Res* **32**(1-3): 317-25.
- Yonish-Rouach, E., C. Choisy, et al. (1996). "The role of p53 as a transcription factor in the induction of apoptosis." *Behring Inst Mitt* **97**: 60-71.
- Young, C. S. (2003). "The structure and function of the adenovirus major late promoter." *Curr Top Microbiol Immunol* **272**: 213-49.
- Yu, A. S., A. Ahmed, et al. (2001). "Liver transplantation: evolving patient selection criteria." *Can J Gastroenterol* **15**(11): 729-38.
- Zentel, H. J., D. Nohr, et al. (1991). "Peptidergic innervation of the Bursa Fabricii: interrelation with T-lymphocyte subsets." *Int J Neurosci* **59**(1-3): 177-88.
- Zhang, S. J., C. J. Zhu, et al. (2003). "Different ischemic preconditioning for rat liver graft: protection and mechanism." *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **2**(4): 509-12.
- Zhu, J., X. Huang, et al. (2007). "Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both TLR-dependent and -independent pathways." *J Virol*.
- Zubieta, C., L. Blanchoin, et al. (2006). "Structural and biochemical characterization of a human adenovirus 2/12 penton base chimera." *Febs J* **273**(18): 4336-45.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Herrn **Prof. Dr. Edward Geissler** danken, dass er sich bereit erklärt hat, die Rolle des Erstgutachters meiner Dissertation zu übernehmen. Mit seinen konstruktiven und kritischen Vorschlägen trug er bei der Fertigstellung meiner Arbeit wesentlich bei.

Ebenso danke ich Herrn **PD Dr. Claus Hellerbrand** für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Vielen Dank auch an Herrn **Prof. Dr. Hans Jürgen Schlitt** für die Möglichkeit in seiner Abteilung für Viszeral-Chirurgie wissenschaftlich zu arbeiten.

Ein großer Dank gilt der medizinisch-technischen Assistentin des chirurgischen Labors **Mandy Vogel**. In den labortechnischen Untersuchungen und Versuchen haben sie mich immer hilfsbereit mit der Technik verschiedenster Versuche vertraut gemacht und bei theoretischen sowie praktischen Fragen unterstützt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn **PD Dr. Alexander Beham** für die interessante Aufgabenstellung und seine administrative Unterstützung v.a. zu Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten im Labor.

Herrn Dr. Markus Rentsch und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die umfangreichen Vorversuche, auf die ich in meine Dissertation aufbauen konnte. Ihre Ideen und Ergebnisse bereicherten meine Arbeit und führten zu einer effektiven Weiterführung.

Auch möchte ich dem **Institut der Pathologie** für die Bereitstellung des Lichtmikroskopes und den damit verbundenen Zeitaufwand bei der Einweisung in die spezifischen Techniken danken. Insbesondere gilt mein Dank Frau **Dr. Katrin Kurz**, die mir überaus freundlich beim Fotografieren der Schnitte half.

Herzlich danke ich meinen Eltern **Anni** und **Wolfgang Schwarz** und Geschwistern **Matthias** und **Stefanie Schwarz**, insbesondere meiner Schwester, ohne deren kritischen und hilfreichen Diskussionen es mir unmöglich gewesen wäre, die Dissertation in dieser Form zu präsentieren.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Schneider -geb. Schwarz
Julia Christiane Brunhilde

Andreasstr. 26
93059 Regensburg
Tel.: 0049 / 941 / 2906100
Handy: 0160 / 350 7774
Email: schneiderjulya@gmx.de

Geboren am 19. Oktober 1981 in Regensburg

Bildungsweg

1988 – 1992	Besuch der Grundschule Burgweinting
1992 – 2001	Besuch des staatlichen Gymnasiums in Neutraubling Belegung der Leistungskurse Chemie und Latein
WS 2001	Beginn des Medizinstudium an der Universität Regensburg
2003	erfolgreicher Physikumabschluss
2008	Abschluss des Studiums mit Staatsexamen

Medizinische Ausbildung

03.09. - 12.10.01	Pflegepraktikum am Caritas Krankenhaus St. Josef in Gynäkologie
27.08. - 16.09.02	Pflegepraktikum am Uniklinikum Regensburg in Chirurgie
14.02. - 09.04.04	Famulatur auf der orthopädischen Station im <i>Ospedale Allessandro Manzoni</i> in Italien (Mailand)
28.08. – 26.09.04	Famulatur im OP (Anästhesie) im Evangelischen Krankenhaus in Regensburg
1.10. – 15.10.04	Werkstudent unter Betriebsarzt Dr. Bauer im BMW-Werk Regensburg
1.09. – 15.09. 05	Famulatur auf der handchirurgischen Station des Klinikum Regensburg
25.03. – 21.04. 06	Praxisfamulatur in Plastischer Chirurgie und Handchirurgie bei Dr. Stefan Ruf in Regensburg

- | | |
|----------------|---|
| 1. PJ- Tertial | Allgemeinchirurgie am <i>Ospedale Beata Virgine</i> in Mendrisio (Schweiz, Kanton Tessin) |
| 2. PJ- Tertial | Innere Medizin am Universitätsklinikum Regensburg mit Schwerpunkt Hämatologie, Intensivmedizin, Kardiologie |
| 3. PJ- Tertial | Institut für Radiologie am Universitätsklinikum Regensburg |

Kenntnisse und Fähigkeiten

Sprachen:

Gefestigte Englischkenntnisse in Wort und Schrift, unterstützt durch dreimalige Teilnahme am Schüleraustausch mit England und Irland, sowie einem zweimonatlichen Aufenthalt in Amerika

Sehr gute Kenntnisse in Italienisch (medizinisch und umgangssprachlich) nach mehrmonatigem Aufenthalt und Praktika in Mailand und italienischer Schweiz (Tessin)

Langjährige Tätigkeit als Nachhilfelehrer in Englisch und Latein

Umfassende Lateinkenntnisse

Nebentätigkeiten

WS 2002 Studentische Hilfskraft im Institut für makroskopische Anatomie an der Universität Regensburg

SS 2005 Studentische Hilfskraft im Institut für mikroskopische Anatomie an der Universität Regensburg

Regelmäßige Betreuung unselbständiger Patienten am Uniklinikum Regensburg (Sitzwache)

Musikalische Ausbildung

Musikalische Ausbildung am Klavier, an der Violine und der Viola

Teilnahme an der Musicalproduktion „Sweet Charity“ des Jugendclubs der Städtischen Bühnen Regensburg

Interessen, Hobbies

Volleyball, Skaten, Skifahren, Wakeboarden

Theater, Kino, Konzerte, Lesen

Internationale e-mail Kontakte, Internetsurfing

Julia Schneider

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Julia Schneider