

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

**Bedeutung humaner Toll-like Rezeptoren  
bei der Abstoßung  
des transplantierten Herzens**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Edgar Zimmer**

aus

Ingolstadt

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. med. Heiko Methe

Mitberichterstatter: Priv.Doz. Dr. med. Peter Kufer  
Priv.Doz. Dr. med. Ulrike Brandl-Selvag

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2009

## **Widmung**

Meiner Ehefrau Carolin sowie meinen Eltern Edith und Helmut gewidmet.

## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Einleitung</b>   | <b>6</b>  |
| 1.1 Herztransplantation und Transplantatabstoßung                     | 6         |
| 1.2 Immunsystem und Abstoßung   | 7         |
| 1.3 Angeborenes Immunsystem – Toll-like Rezeptoren                    | 8         |
| 1.4 Erworbenes Immunsystem  | 12        |
| 1.5 Immunologie der Transplantatabstoßung                             | 15        |
| 1.6 Transplantatvaskulopathie   | 17        |
| <b>2 Arbeitshypothese und Fragestellung</b>                           | <b>21</b> |
| <b>3 Material und Methoden</b>  | <b>22</b> |
| 3.1 Patienten   | 22        |
| 3.2 Untersuchung Endothelfunktion                                     | 23        |
| 3.3 Blutentnahme und -aufbereitung                                    | 23        |
| 3.4 Materialien (Antikörper, Lösungen, Puffer, Reagenzien und Geräte) | 24        |
| 3.5 Untersuchungstechniken  | 25        |
| 3.5.1 Durchflusszytometrie  | 25        |
| 3.5.1.1 hTLR2 und hTLR4   | 26        |
| 3.5.1.2 B7-1  | 28        |
| 3.5.2 ELISA   | 29        |
| 3.5.2.1 IL-12   | 29        |
| 3.5.2.2 TNF- $\alpha$   | 30        |
| 3.5.3 PCR   | 30        |
| 3.6 Statistische Auswertung   | 32        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4 Ergebnisse</b>  | <b>33</b> |
| 4.1 Demographie der Herztransplantatempfänger  | 33        |
| 4.2 Mikrovaskuläre vasomotorische Funktion   | 35        |
| 4.3 Expression von Toll-like Rezeptoren auf zirkulierenden CD14 <sup>+</sup> Monozyten | 35        |
| 4.3.1 Expression von hTLR2 und hTLR4 auf CD14 <sup>+</sup> Zellen                      | 35        |
| 4.3.1.1 Expansion von CD14 <sup>+</sup> /hTLR2 <sup>+</sup> Monozyten                  | 36        |
| 4.3.1.2 Expansion von CD14 <sup>+</sup> /hTLR4 <sup>+</sup> Monozyten                  | 38        |
| 4.3.2 mRNA Transkriptionslevel für hTLR4 auf CD14 <sup>+</sup> Zellen                  | 41        |
| 4.3.3 Korrelation von hTLR2 und hTLR4 mit der koronaren Flussreserve                   | 42        |
| 4.4 Downstream-Effekte der Aktivierung von Toll-like Rezeptoren                        | 44        |
| 4.4.1 Expression von B7-1 auf CD14 <sup>+</sup> Zellen                                 | 44        |
| 4.4.2 mRNA Transkriptionslevel für B7-1 auf CD14 <sup>+</sup> Zellen                   | 47        |
| 4.4.3 Korrelation von B7-1 mit der koronaren Flussreserve                              | 48        |
| 4.4.4 IL-12 Sekretion  | 49        |
| 4.4.5 TNF- $\alpha$ Sekretion  | 51        |
| <b>5 Diskussion</b>  | <b>53</b> |
| <b>6 Zusammenfassung</b>   | <b>61</b> |
| <b>7 Literaturverzeichnis</b>  | <b>63</b> |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>   | <b>82</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>   | <b>84</b> |
| <b>Danksagung</b>  | <b>85</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Herztransplantation und Transplantatabstoßung

Die Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz hat in den letzten Jahrzehnten mit dem immer höher werdenden Durchschnittsalter der Bevölkerung deutlich zugenommen. Für die höchstgradige terminale Herzinsuffizienz ist nach Ausschöpfung aller medikamentösen, chirurgischen und interventionellen Behandlungsmethoden die orthotope Herztransplantation (HTx) ein effektives, gut etabliertes und kausales Therapieverfahren.

Durch den Eingriff wird sowohl die Lebenserwartung der betroffenen Patienten deutlich verlängert, als auch die Lebensqualität erheblich verbessert (18, 38).

In der Anfangszeit nach Etablierung der orthotopen Herztransplantation, die erste erfolgreiche allogene Herztransplantation wurde am 03. Dezember 1967 von Christiaan Barnard im Groote Schuur Hospital in Kapstadt durchgeführt (10, 11), verstarben viele Patienten in der Frühphase nach der Operation an einer akuten Abstoßungsreaktion des Organs oder an Infektionen. Mit Etablierung des immunosuppressiv wirksamen Calcineurininhibitors Cyclosporin A (15, 16, 88) gelang es, die akute Abstoßung besser medikamentös zu beherrschen. Durch Einführung des so genannten HLA-Matching und des Crossmatch-Screening (= Lymphozyten-Verträglichkeitsprobe) sowie durch die Weiterentwicklung von immunosuppressiven Medikamenten im Laufe der letzten Jahre, konnte die akute Transplantatabstoßung weitestgehend inhibiert werden (118).

Vergleicht man die Überlebenskurven nach Herztransplantation in unterschiedlichen Zeiträumen miteinander, ist festzustellen, dass zwar die 1-Jahres-Überlebensrate gestiegen ist, hingegen die langfristigen Überlebenskurven identisch geblieben sind. Mit einer konstanten jährlichen Mortalitätsrate sind die Kurven ab dem 12. Monat post-transplantationem über die letzten Jahre hinweg vergleichbar (Abbildung 1)(118).

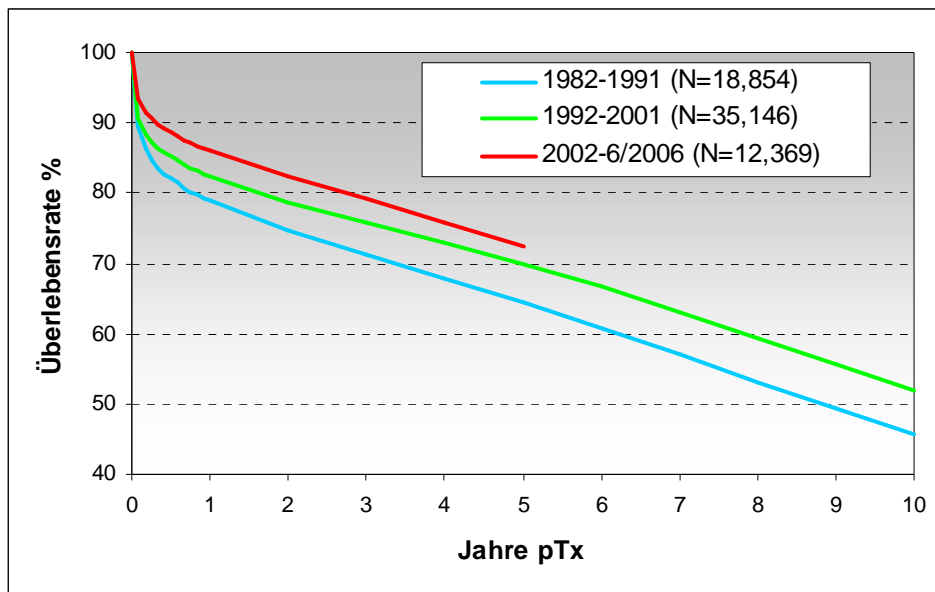


Abbildung 1: Überlebenskurven nach Herztransplantation (52)  
pTx: post-transplantationem

Daraus lässt sich unter anderem schließen, dass zwar die akute immunologische Abstoßungsproblematik verbessert wurde, die chronische Abstoßung des Transplantats über die letzten 20 Jahre aber nicht wesentlich beeinflusst werden konnte. So ist neben den durch Immunsuppression induzierten lymphoproliferativen Erkrankungen und Malignomen die chronische Abstoßungsreaktion in Form einer Transplantatvaskulopathie des transplantierten Herzens noch immer eine der häufigsten Ursachen für ein Transplantatversagen jenseits des ersten Jahres nach Transplantation (27).

## 1.2 Immunsystem und Abstoßung

Jedes allogenes, das heißt zwischen genetisch verschiedenen Individuen derselben Spezies, transplantierte Gewebe generiert im Empfänger physiologischerweise eine Aktivierung des Immunsystems im Sinne einer Abstoßungsreaktion. Die Initiierung einer Immunantwort wird ganz allgemein als Zusammenspiel von angeborener (engl.: innate) und erworbener (engl.: adaptive) Immunantwort verstanden. Die

Abwehrvorgänge lassen sich dabei in zwei Hauptabschnitte gliedern: Während Mechanismen der angeborenen Immunität über die grundsätzliche Aktivierung oder Anergie des Immunsystems durch Erkennen von antigenen Molekülstrukturen entscheiden, vermitteln Mechanismen der erworbenen Immunität eine zielgerichtete und fein abgestimmte Effektorfunktion mit Zerstörung des antigenen Gewebes.

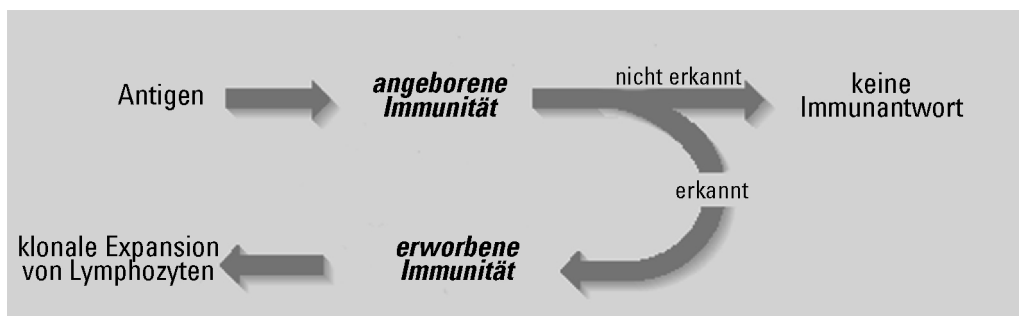


Abbildung 2: Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Immunantwort

### 1.3 Angeborenes Immunsystem – Toll-like Rezeptoren

Das angeborene Immunsystem reagiert auf Fremdan Antigene nach der Erkennung von relativ unspezifischen Gewebsmustern, sogenannten PAMP (engl.: pathogen associated molecular patterns), durch eine Vielzahl unterschiedlicher phylogenetisch alter Rezeptoren. Dazu gehören die am intensivsten erforschten Toll-like Rezeptoren, aber auch andere wie Scavenger Rezeptoren, C-type Lectin Rezeptoren und NOD-like Rezeptoren (07, 25). PAMP sind über Millionen von Jahren konservierte Gewebsmuster des mikrobiellen Metabolismus. Sie sind unveränderlich innerhalb von Pathogenklassen und stellen eine spezifische Signatur dieser Klasse dar. Die genaue Rezeptorstruktur zur Erkennung von PAMP in Vertebraten war bis vor wenigen Jahren unbekannt.

Nach Untersuchungen des Transmembranrezeptors „Toll“ in der Drosophila-Fliege durch Nüsslein-Volhard et al. 1985 (03), beschrieben Medzhitov und Janeway erstmals 1997 die humanen Homologe, die als humane Toll-like Rezeptoren (hTLR) bezeichnet wurden (81, 101). Im Laufe der Jahre konnten diese



Transmembranproteine als essentielle Vermittler der angeborenen Immunantwort identifiziert werden.

In *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) kontrolliert die Toll-Signalkaskade neben Prozessen bei der Ontogenese in der adulten *Drosophila*-Fliege die Induktion von potenten antimikrobiellen Faktoren (72). Auch in Pflanzen spielen Signalwege homolog dem Toll-System eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Krankheitsresistenzen.

Erstaunliche Parallelen im Abwehrmechanismus bei Pflanzen, primitiven Insekten und hochentwickelten Wirbeltieren legen den Schluss nahe, dass dieser Signalübertragungsweg phylogenetisch sehr alt ist und bereits vor der Divergenz von Pflanzen und Tieren hervorging. Dass er in der Evolution als ein Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems gegen Pathogene über Millionen von Jahren auch bei Vertebraten bewahrt blieb, zeigt seine enorme Bedeutung für das Überleben.

Bisher wurden 11 TLR beim Menschen identifiziert (21, 47, 101), wobei in der Fachliteratur auch wiederholt neue Rezeptoren Erwähnung finden, ohne dass deren genaue exogenen oder endogenen Liganden bekannt sind (77, 78). Die Gruppe der hTLR besitzen als Transmembranproteine sich wiederholende leucinreiche Bereiche in ihrer extrazellulären Domäne, beziehungsweise an einem Pol. Da der zytoplasmatische Anteil eine große Homologie zu dem Typ 1 Interleukin (IL)-1-Rezeptor aufweist (35), wurden hTLR der Superfamilie der IL-1 Rezeptoren zugeordnet.

Von den bisher beschriebenen hTLR ist die Bedeutung von hTLR2 und hTLR4 am besten charakterisiert. Diese beiden Subtypen werden vor allem auf antigen-präsentierenden Zellen (APC) unter anderem auf CD14<sup>+</sup> Monozyten exprimiert (19, 81, 120, 135).

Zu den am besten untersuchten exogenen Liganden für hTLR4 gehört das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS = Endotoxin), eine Hauptzellwandkomponente der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien (123). Es bindet, wenn es mit LPS-binding-

protein (LBP) assoziiert ist, mit hoher Affinität an das Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Membranprotein CD14 als Korezeptor und das TLR4 Protein als eigentlichen signalübertragenden Rezeptor. TLR4 ist zur Erkennung von LPS auf das auf der Zelloberfläche exprimierte Molekül MD-2 angewiesen (01, 113). Erst der CD14/TLR4-MD-2/LPS Komplex führt zur Aktivierung der TLR4-vermittelten intrazellulären Signalkaskade (04, 124).

Dabei gibt es zwei wesentliche Signalübertragungswege (117):

Die MyD88-abhängige Signalübertragung (siehe Abbildung 3) wird durch das Adaptermolekül MyD88 und die Serin-Threonin-Protein-Kinase IL-1-R-assoziierte Kinase (IRAK) vermittelt. MyD88 bindet an TLR4 und rekrutiert IRAK zu dem Komplex hinzu. IRAK aktiviert die zur Familie der „mitogen-activated protein kinase kinase kinase“ (MAP3K) gehörende Nuklear-Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) -induzierende-Kinase (NIK) in einem von Tumor-Nekrose-Faktor-receptor-associated-factor-6 (TRAF-6)-vermittelten Schritt. NIK aktiviert in der Kaskade sogenannte I- $\kappa$ B-Kinasen (IKKs). Die aktivierte IKK-2 wiederum phosphoryliert den Inhibitor of NF- $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) an dessen amino-terminalen Domäne. Sobald der NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B-Komplex phosphoryliert ist, kommt es zur Assoziation einer Ubiquitin-Ligase, die zur Dissoziation des NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B-Komplex führt und I- $\kappa$ B für den Abbau in Proteasomen markiert. Durch die Ablösung von I- $\kappa$ B wird ein Lokalisationssignal auf NF- $\kappa$ B freigegeben, so dass dieser Transkriptionsfaktor in den Zellkern migrieren kann. Nach Translokation bindet NF- $\kappa$ B dann an spezifische Sequenzen in den Promoterregionen von immunmodulatorischen Genen, die für proinflammatorische Zytokine (unter anderem TNF- $\alpha$ , Interleukin IL-6 und IL-12) und kostimulatorische Moleküle (unter anderem B7-1) kodieren (66, 91). NF- $\kappa$ B agiert somit als ein second-messenger-System, das Aktivierungssignale aus dem Zytoplasma in den Nukleus überträgt.

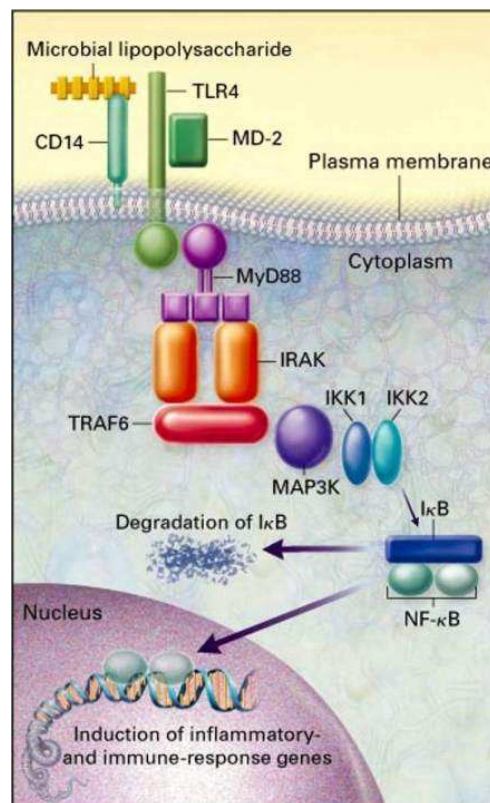


Abbildung 3: Intrazelluläre TLR4-Signalkaskade (hier NF-κB Signalkaskade) (82)

Die MyD88-unabhängige Signalübertragung erfolgt über das initiale Zusammenspiel der Adaptermoleküle TRAM mit TRIF und über die weiteren Mediatoren IKK $\epsilon$ , IKK $\iota$  und TBK-1, welche zur Phosphorylierung und damit Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 führen. Dieser induziert letztendlich die Synthese von Interferon- $\beta$  (117).

Neben LPS als exogenem Liganden für hTLR4 wurden andere spezifische exogene, aber auch endogene Liganden für weitere Toll-Rezeptoren charakterisiert. Neben hsp60 (132, 133, 134) und Peptidoglykan (70), für die bereits ein Zusammenhang mit der Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen gezeigt werden konnte, sind Fibrinogen, Fibronectin, minimal modified LDL, Heparinsulfat und Hyaluronsäure weitere endogene hTLR4-Liganden (92, 111).

Im Gegensatz zu hTLR4 dient hTLR2 als Rezeptor für bakterielle Lipoproteine (bLP) von gram-positiven Bakterien. Nach Stimulation mit bLP produzieren hTLR2-

exprimierende Zellen NF- $\kappa$ B-abhängig unter anderem das T-Helfer (TH)1 Inducerzytokin IL-12 (02, 17).

Die Aktivierung von antigen-präsentierenden Zellen über TLR kann somit über die beschriebene Zytokinkaskade zur Aktivierung der sogenannten erworbenen Immunantwort mit Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in TH1-Zellen führen.

#### 1.4 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene Immunsystem setzt sich vor allem aus B- und T-Lymphozyten zusammen. T-Lymphozyten können in CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-zytotoxische-Zellen und regulatorische T-Lymphozyten differenzieren (67, 99).

Die Ausdifferenzierung und Aktivierung der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erfordert die Präsentation von Antigenen über Moleküle des major histocompatibility complex (MHC). Die auf die Aktivierung anderer Immunzellen spezialisierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen über den T-Zell-Rezeptor Antigene, welche in Assoziation mit MHC-Klasse II präsentiert werden. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen binden an MHC-Klasse I Moleküle.

Entscheidend für eine suffiziente Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist außerdem die Expression von kostimulatorischen Signalmolekülen (wie zum Beispiel B7-1 oder B7-2) für Rezeptor-Ligand-Interaktionen durch die APC (55, 75, 76). Eine alleinige Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor auf Lymphozyten und den MHC-Molekülen auf APC ohne gleichzeitige Stimulation über kostimulatorische Moleküle führt zur Anergie der T-Zelle. Die absolute Notwendigkeit der primären Kostimulation zeigt sich auch darin, dass einmal aufgrund mangelnder kostimulatorischer Signale anerg gewordene Zellen bei erneutem Kontakt mit APC, selbst wenn diese nun kostimulatorische Moleküle präsentieren, nicht wieder zu aktivieren sind. Die Stimulation der Korezeptoren bzw. die Blockierung der Stimulation durch Neutralisation der entsprechenden Liganden B7-1 und B7-2 haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Immunantwort.

Nach Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen müssen diese einen Prozess der Differenzierung durchlaufen. Der primäre antigene Stimulus entscheidet dabei (vermittelt durch spezifische Transkriptionsfaktoren), ob naive CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in Effektorzellen vom Typ T-Helfer 1 (TH1) oder T-Helfer 2 (TH2) (89) ausdifferenzieren. Diese T-Helferzellen-Subpopulationen sind durch ein jeweils unterschiedliches Muster spezifischer Zytokine charakterisiert. Entsprechend ihrer verschiedenen Zytokinprofile kommen ihnen auch jeweils verschiedene funktionelle Eigenschaften zu (90). Eine schematische Übersicht der Differenzierung ist in Abbildung 4 dargestellt.

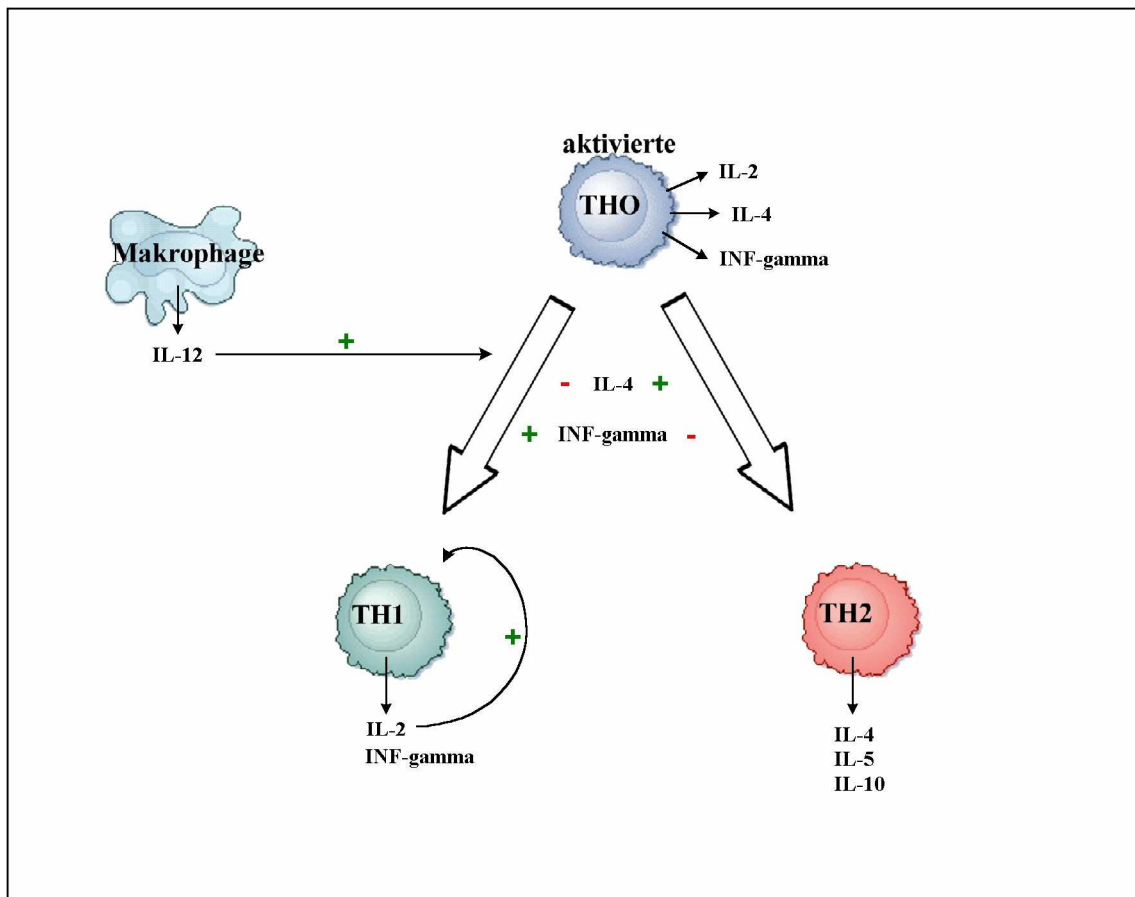


Abbildung 4: Differenzierung der T-Helfer-Lymphozyten

Die Entwicklung der TH1- oder TH2-Zellen aus naiven T-Helfer-Vorläuferzellen

verläuft also über eine gemeinsame Vorstufe, den sogenannten TH0-Zellen. Diese sezernieren sowohl IL-2 und INF- $\gamma$  als auch IL-4 (30, 59, 102).

Desweiteren können neben den beiden T-Helfer Zelltypen aus der gemeinsamen Vorstufe der TH0-Zellen aber auch so genannte regulatorische T-Zellen (T-Regs) hervorgehen. Diese spezialisierte Untergruppe der T-Zellen hat die Funktion die Aktivierung des Immunsystems zu supprimieren und dadurch die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren. Darüber hinaus gibt es auch Hinweise, dass T-Regs an der Limitierung einer Immunantwort gegenüber Fremdartigen beteiligt sind. Die regulatorischen T-Zellen können wiederum aufgrund spezieller phänotypischer Marker und spezifischer Zytokinprofile in unterschiedliche Subpopulationen (CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>+</sup>-T-Reg-Zellen, TR1-Zellen, TH3-Lymphozyten) unterteilt werden (125).

Die zentrale Effektorfunktion der TH1-Lymphozyten liegt in der Verstärkung der zellulären Immunantwort durch Expression und Sekretion von Zytokinen wie IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$ , die z.B. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder Makrophagen aktivieren können. Durch die äußerst effektiven, aber auch sehr aggressiven Abwehrmechanismen der aktivierten Makrophagen, kommt deren sensiblen Regulation über die INF- $\gamma$  Produktion durch inflammatorische T-Lymphozyten eine hohe Priorität zu.

TH2-Zellen hingegen begünstigen durch Freisetzung von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 die Differenzierung von B-Lymphozyten in antikörper-produzierende Plasmazellen und inhibieren die Makrophagenaktivierung. Das sezernierte IL-4 ist als wesentlicher Faktor an der humoralen Immunantwort beteiligt. Es leitet die Umwandlung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen ein, welche dann spezifische Immunglobuline gegen spezifische Fremdartigen produzieren.

Dem Aktivierungs- und vor allem dem nachfolgenden Differenzierungsschritt naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen kommt eine zentrale Bedeutung für den weiteren Verlauf der erwarteten Immunantwort zu. Sie finden unter Einfluss bestimmter Zytokine in den ortständigen Lymphknoten statt. Dabei spielt das umgebende Zytokinmilieu, in dem sich die T-Lymphozyten zum Zeitpunkt des Kontaktes mit den APC befinden, eine entscheidende Rolle (96).

Es konnte gezeigt werden, dass TLR-aktivierte APC über Sekretion von IL-12 und Expression von B7-1 eine Ausdifferenzierung aktivierter T-Helfer-Zellen in TH1-Zellen triggern (12). IL-12 kommt dabei eine zentrale Stellung bei der Differenzierung in Richtung TH1 zu.

Nach Bindung an seinen Rezeptor aktiviert IL-12 intrazellulär die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT4 (engl.: STAT = signal transducer and activator of transcription) (53). Durch gezielte Deletion des Gens für STAT4 lässt sich die TH1-spezifische Immunantwort in Mäusen signifikant inhibieren (60, 119). Als ein weiteres Zytokin ist INF- $\gamma$  im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus ebenfalls an der TH1-Polarisierung entscheidend beteiligt. Es induziert die IL-12 Synthese in Makrophagen (100, 121) und gleichzeitig die IL-12-Rezeptor Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Mit Hilfe des autokrinen Zytokins IL-2 können bereits differenzierte TH1-Zellen ihre eigene Wirkung amplifizieren. Somit können IL-12 und IL-2 als Inducerzytokine für das TH1-Programm angesehen werden.

Dagegen benötigt die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu TH2-Zellen die Anwesenheit des Inducerzytokins IL-4, welches vor allem von aktivierten Mastzellen, basophilen Granulozyten, CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> T-Zellen, einigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und auch autokrin von aktivierten TH2-Zellen selbst freigesetzt wird (103). IL-4 aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT6 (51). Mäuse, in denen das STAT6 Gen ausgeschaltet wurde, können keine TH2-Immunantwort ausbilden (61, 116).

Eine Interaktion zwischen angeborenem Immunsystem über TLR und erworbenem Immunsystem über CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Folge der Bindung von exogenen oder endogenen Liganden an TLR, ist in Zusammenschau der zitierten Literaturstellen belegt. Dabei kommt dem direkten Weg über Aktivierung der TLR bis zur Ausdifferenzierung von TH1-Zellen ein besonderes Augenmerk zu (109).

## 1.5 Immunologie der Transplantatabstoßung

Die Allotransplantatabstoßung ist ein komplizierter entzündlicher Vorgang, bei dem zelluläre und humorale Kaskaden durch das allogene Spendergewebe im Empfänger

ausgelöst werden. Grundlage des immunologischen Phänomens Abstoßung ist das HLA-System (Human leukocyte antigen), beziehungsweise der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex = MHC) (24). Es handelt sich dabei um genetisch determinierte Zelloberflächenmoleküle, die auf allen Zellen des menschlichen Körpers nachgewiesen werden können und entscheidend an der Fähigkeit des menschlichen Immunsystems zwischen eigen und fremd zu differenzieren beteiligt sind. Die Individualität jedes einzelnen Organismus ist durch einen hochgradigen Polymorphismus aufgrund von multipler Allelie gewährleistet (09). Man unterscheidet die auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten vorkommenden MHC-Klasse I Antigene von den MHC-Klasse II Antigenen, die vor allem auf B-Lymphozyten, Makrophagen und bestimmten endothelialen und epithelialen Zellen exprimiert werden (23).

Unter dem allgemeinen Begriff der Abstoßungsreaktion fasst man die hyperakute, akute, subakute und chronische Abstoßung zusammen. Die einzelnen Formen unterscheiden sich dabei erheblich in ihrem zeitlichen Auftreten, wie auch in Umfang und Art der beteiligten Zellen.

a) Die hyperakute Abstoßung ereignet sich innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Transplantation und verläuft fulminant. Sie wird durch im Empfänger vorhandene präformierte Antikörper gegen Transplantantantigene verursacht (22). Über die weitere Aktivierung des Komplementsystems kommt es zu Thrombosierung und letztendlich ischämischer Organnekrose (36). Durch das prä-operative routinemäßige ABO-Blutgruppenmatching, HLA-Matching und das Crossmatch-Screening wird diese Form der Abstoßung heute größtenteils verhindert.

b) Die akute und subakute Abstoßung spielt sich nach Tagen bis Wochen ab. Bei dieser zellvermittelten Reaktion aus dem Formenkreis der Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ (Immunreaktion Typ IV) findet eine Infiltration des Transplantatparenchyms mit Lymphozyten des Empfängers statt. Die primäre Aktivierung dieser Empfänger-T-Lymphozyten erfolgt vor allem durch Erkennung von HLA-Unterschieden und führt zur Migration von mononukleären Zellen in das Parenchym des Transplantats (22). Die akute Abstoßung ist durch die



Anwendung von medikamentösen Immunsuppressiva (unter anderem Calcineurinantagonisten, Sirolimus, Mycophenolatmofetil) klinisch weitestgehend beherrschbar geworden.

c) Die chronische Abstoßung entwickelt sich Monate bis Jahre nach der Transplantation. Während sich akute Abstoßungsreaktionen vor allem im transplantierten Organparenchym abspielen, betrifft die chronische Form das Gefäßsystem (sogenannte Transplantatvaskulopathie).

### **1.6 Transplantatvaskulopathie**

Die Pathogenese der Transplantatvaskulopathie ist noch nicht endgültig verstanden. Eine Theorie scheint sich allerdings zunehmend mehr zu bestätigen. Dabei wird eine Schädigung der Endothelzellen als „initial injury“ analog zur Entstehung der klassischen Arteriosklerose, für die Russell Ross 1986 das „response to injury“-Modell in Anlehnung an Virchow formulierte (104, 105, 106), als auslösender Faktor für die Transplantatvaskulopathie angesehen. Das transplantierte Endothel stellt dabei die immunologische Grenze zwischen fremd und eigen dar. Die Auswirkungen des „response to injury“ sind vornehmlich Folge einer primären Aktivierung des Immunsystems im Empfängerorganismus durch die Endothelzellschicht des transplantierten Organs (20).

Daneben stellen Infektionen (zum Beispiel Cytomegalie-Virus) (39, 97), Lipidabnormalitäten (130, 131) und Endothelzellverletzungen im Rahmen der Operation weitere prädisponierende Faktoren für das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion dar.

In der Folge kommt es zur Infiltration von Makrophagen und aktivierten Lymphozyten mit nachfolgender Intimaproliferation, die zu einer progressiven luminalen Einengung der Gefäße führt und letztendlich in einer Ischämie des nachfolgenden Stromgebietes resultiert.

Trotz erheblichen Verbesserungen der Basisimmunsuppression mit Azathioprin, Kortikoiden und Cyclosporin A sowie neuen hochpotenten Immunsuppressiva wie

Tacrolimus (34), Sirolimus und Mycophenolatmofetil konnte die Inzidenz der chronischen Abstoßungsreaktion nicht entscheidend beeinflusst werden. Die durchschnittliche 10-Jahres-Überlebensrate nach orthotoper Herztransplantation liegt dementsprechend nur bei 52 % (52).

Mittels Angiographie der Koronargefäße findet man bei 14 %, 37 % und 50 % der Patienten, ein, drei und fünf Jahre nach der Transplantation nachweisbare Veränderungen im Sinne einer Transplantatvaskulopathie (110). Mit der intravaskulären Doppleruntersuchung lässt sich durch deren höhere Sensitivität (49, 68, 69) bereits nach dem ersten Jahr bei 35 % und nach drei Jahren bei 45 % der Patienten eine endotheliale Dysfunktion als erstes klinisches Anzeichen einer Transplantatvaskulopathie feststellen (128). Histologisch lassen sich Zeichen einer Transplantatvaskulopathie fünf Jahre nach allogener Herztransplantation bei ca. 90 % aller Patienten sichern (136).

Frühe klinische Symptome, wie Angina pectoris, können wegen der Denervation des Transplantats vom Patienten meist nicht wahrgenommen werden (54, 110, 114). Die tragenden Säulen zur rechtzeitigen Diagnosestellung der Transplantatvaskulopathie sind somit die Koronarangiographie, der intravaskuläre Ultraschall (IVUS) sowie der intravaskuläre Doppler im Rahmen jährlicher Kontrolluntersuchungen.

Anatomisch und histologisch beschränken sich die vaskulären Veränderungen auf das Transplantat mit dem Spendersegment der Aorta, und enden mit den Anastomosen zum Empfängerorganismus (06, 127). Im Gegensatz zur „herkömmlichen“ klassischen Arteriosklerose, die fokal vor allem an den Bifurkationen der proximalen epikardialen Gefäße auftritt, zu exzentrischen Stenosen neigt, oft Kalzifikationen zeigt (13, 62) und bei der die Lamina elastica interna in der Regel nicht mehr intakt ist (05, 13), befällt die Transplantatvaskulopathie charakteristischerweise diffus multifokal alle Gefäßabschnitte. Es sind sowohl die proximalen Hauptäste als auch die distalen feinen Verzweigungen betroffen. Typischerweise führt die Transplantatvaskulopathie zu konzentrischer Intimahyperplasie. Auf Dauer kommt es dadurch zu Obstruktionen ohne Kollateralenbildung, kardialer Ischämie und dem damit verbundenen Verlust der Transplantatfunktion (107).

Die Transplantatvaskulopathie zeigt außerdem im Vergleich zur klassischen Arteriosklerose ein akzeleriert verlaufendes Wachstum und betrifft sowohl das arterielle, wie auch das venöse Gefäßbett (93). Erst im späteren Verlauf der Erkrankung nähert sich ihr morphologisches Bild dem der Koronararteriosklerose beim nichttransplantierten Patienten an (14, 98).

Die einzelnen Merkmale und Unterschiede von Transplantatvaskulopathie und klassischer Arteriosklerose sind in einem Vergleich in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

|                                    | <b><u>Transplantat-<br/>vaskulopathie</u></b> | <b><u>Klassische<br/>Arteriosklerose</u></b> |
|------------------------------------|---|--|
| Lokalisation                       | diffus  | fokal  |
| Ausdehnung                         | konzentrisch                                  | exzentrisch                                  |
| Befall kleiner Gefäßäste           | beteiligt                                     | ausgespart                                   |
| Befall venöser Gefäße              | ja  | nein   |
| Kalkablagerungen                   | selten  | häufig                                       |
| Atherome                           | selten  | häufig                                       |
| Lamina elastica interna            | größtenteils intakt                           | beschädigt                                   |
| Kollateralisierung                 | schlecht                                      | meist gut                                    |
| Risikofaktoren der Arteriosklerose | größtenteils unabhängig                       | stark abhängig                               |

Tabelle 1: Anatomische und histologische Unterschiede zwischen  
Transplantatvaskulopathie und klassischer Arteriosklerose

Die genauen immunologischen Abläufe die zur Ausbildung einer Transplantatvaskulopathie führen, werden noch immer nicht völlig verstanden. Es gibt allerdings einige Hinweise, die eine kausale Beteiligung von TH1-Zellen für die Initiierung und Progression der Transplantatvaskulopathie nahe legen. So konnten zum Beispiel Koglin et al. 2000 in einem Mausmodell der chronischen Abstoßung

zeigen, dass eine durch STAT4-vermittelte TH1 Differenzierung zu einer pro-arteriosklerotischen Effektorfunktion des erworbenen Immunsystems in transgenen Mäusen führt (65). In STAT4-Knockout-Mäusen war die Frequenz und der Schweregrad von Gefäßverschlüssen nach Herztransplantation signifikant reduziert. Diese Verminderung ist auch mit einer verringerten Expression der TH1 Signalzytokinen INF- $\gamma$  und IL-2 verbunden. STAT4 vermittelte Immunprozesse sind entscheidend an der Entstehung und der Entwicklung der Transplantatvaskulopathie beteiligt, indem sie TH1 spezifische Effektorfunktionen auslösen. In einer Folgestudie konnte die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humane Situation gezeigt werden, indem das Zytokinmuster aktivierter Lymphozyten in Patienten mit und ohne Endotheldysfunktion (als frühen Marker einer beginnenden Arteriosklerose) verglichen wurde. Patienten mit Endotheldysfunktion waren durch eine signifikant gesteigerte Expression von TH1-Markern (IL-2, INF- $\gamma$ , STAT4) auf T-Lymphozyten charakterisiert (85). Offen bleibt aber weiterhin der zu Grunde liegende Regulationsmechanismus, welcher zu einer vermehrten TH1-Differenzierung führt. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte in einer primären Aktivierung angeborener Immunmechanismen mit nachfolgender Aktivierung von Effektorzellen des erworbenen Immunsystems liegen.

## 2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Naive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sind nach Präsentation eines Antigens ausschließlich in Anwesenheit eines kostimulatorischen Signals (wie zum Beispiel B7-1) sowie unter Stimulation durch Inducerzytokine (wie zum Beispiel IL-12) in der Lage, in spezialisierte TH1-Lymphozyten als Teil der erworbenen Immunantwort auszdifferenzieren. Für TH1-Lymphozyten konnte bereits eine essentielle Rolle in der Pathogenese der immunologisch vermittelten chronischen Abstoßungsreaktion gezeigt werden. Offen bleibt jedoch die Frage, durch welche Signale die Effektorfunktionen des erworbenen Immunsystems im Rahmen der chronischen Transplantatabstoßung aktiviert werden.

Als zentrale Hypothese wird postuliert, dass es über Stimulation von hTLR2- und hTLR4-Rezeptoren zu einer Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade mit Initiierung einer angeborenen Immunantwort kommt, welche letztendlich in einer chronischen Transplantatabstoßungsreaktion mündet. Diese Hypothese soll durch Untersuchung folgender Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wie werden hTLR2 und hTLR4 auf zirkulierenden CD14<sup>+</sup> Monozyten von transplantierten Patienten mit und ohne Transplantatvaskulopathie exprimiert?
2. Welche immunologischen Downstream-Effekte (B7-1 als kostimulatorisches Signal, TNF- $\alpha$  und IL-12 als TLR-abhängige Zytokine) werden durch die veränderte Expression von hTLR2 und hTLR4 in diesen Patienten ausgelöst?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Patienten**

Die Durchführung der Studie an Probanden wurde von der lokalen Ethikkommission gebilligt und die ethischen Richtlinien des Helsinki-Protokolls durch die Studiengruppe berücksichtigt.

Im Zeitraum von Mai bis August 2001 wurden insgesamt 48 herztransplantierte Patienten und 12 Normalprobanden untersucht. Die Transplantationen wurden zwischen 1991 und August 2000 durchgeführt. Die Patienten stellten sich im Rahmen der jährlichen Routineuntersuchung nach HTx im Klinikum Großhadern vor. Vor Studieneinschluss wurde eine akute oder chronische Infektion bei den Patienten ausgeschlossen. Sie wurden über die Verwendung des Blutes zu Forschungszwecken aufgeklärt und waren damit schriftlich einverstanden. Die Patienten wurden anhand der Dauer nach Herztransplantation zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses in eine frühe Gruppe (12 - 36 Monate nach dem Eingriff, n = 38) und eine späte Gruppe (6 - 10 Jahre nach der Transplantation, n = 10) unterteilt. Diese willkürlich gesetzte Grenze der Unterscheidung von früh- und spät-transplantierten Patienten basierte auf folgenden klinischen Überlegungen: Die Untergruppe von herztransplantierten Patienten, welche die aggressivste Form der Transplantatvaskulopathie entwickeln, kann ab diesem Zeitpunkt sicher klinisch differenziert werden. Zusätzlich wird am Klinikum Großhadern drei Jahre nach Transplantation die immunsuppressive medikamentöse Therapie von einem engmaschig kontrollierten Tripel-Schema auf eine Zweifach-Therapie mit niedrigeren Zieldosen umgestellt.

Die Gruppe früh nach Herztransplantation wurde zudem in Patienten mit Endotheldysfunktion (n = 13) und ohne Endotheldysfunktion (n = 25) unterteilt.

Als Kontrollgruppe dienten 12 asymptomatische Freiwillige ohne Anzeichen einer kardiovaskulären Erkrankung in der Vorgeschichte, die in der Alters- und Geschlechtsverteilung der Studiengruppe entsprachen.

Einen Überblick über die Studiengruppeneinteilung bietet folgendes Studienschema:

## Bedeutung humaner Toll-like Rezeptoren bei der Abstoßung des transplantierten Herzens

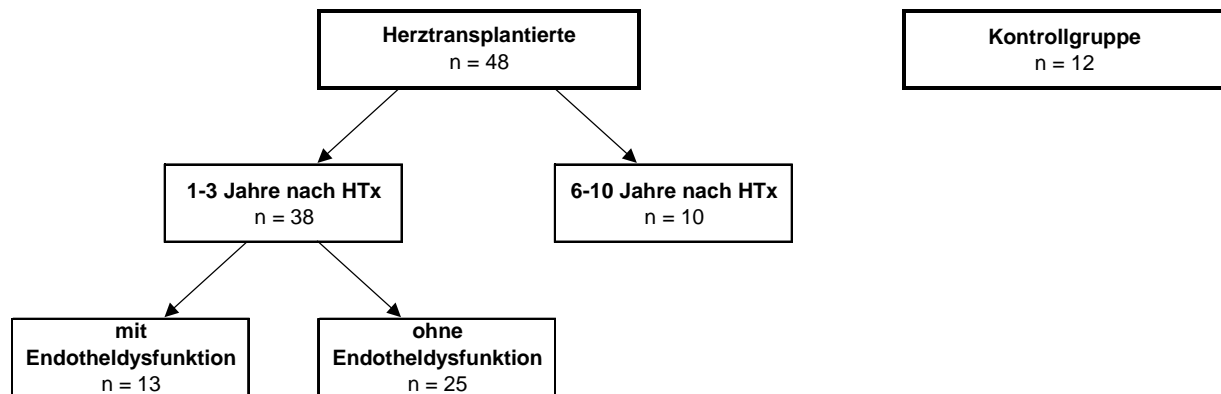


Abbildung 5: Studienschema

### 3.2 Untersuchung Endothelfunktion

Die endotheliale Dysfunktion gilt als das früheste, klinisch detektierbare Zeichen einer Gefäßläsion des Transplantats (49, 68). Zur Beurteilung der Endothelfunktion im Rahmen der Herzkatheternachsorge diente ein 0,014" Doppler Flow-wire (FloWire, Cardiometrics Inc., Mountain View, California), mit dessen Hilfe die koronare Flussgeschwindigkeit gemessen wurde. Als Parameter wurde unter intrakoronarer Applikation des endothel-abhängigen Vasodilatators Acetylcholin (30 µg/min i.c. über 5 min) die Flussreserve bestimmt. Eine koronare Flussreserve (engl.: coronary flow reserve = CFVR) kleiner 2 wurde als Zeichen einer endothelialen Dysfunktion verstanden (48, 129).

### 3.3 Blutentnahme und -aufbereitung

Bei jedem Studienteilnehmer wurde Vollblut peripher-venös zum Zeitpunkt der endothelialen Funktionstestung (frühe Gruppe) oder bei der koronaren Angiographie (späte Gruppe) entnommen und, um die Gerinnung zu verhindern, sofort auf zwei Ficoll-Röhrchen (BD Biosciences, Vacutainer CPT) zu je 8 ml verteilt. Die Vacutainer wurden gut geschwenkt und bis zur Weiterverarbeitung liegend gelagert.

Durch Zentrifugation (2800 rpm, 20 min, RT) konnten die peripheren mononukleären Zellen aufgrund des Dichtegradienten vom Gesamtblut isoliert werden. Der

Serumüberstand wurde abpipettiert und die mononukleäre Zellschicht (trübe weiße Phase) mit den CD14<sup>+</sup>-Monozyten zur weiteren Aufbereitung in 15 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt) überführt. Um die Zellausbeute zu erhöhen, wurden die Vacutainer vorsichtig mit 5 ml PBS (Gibco BRL) gespült. Damit konnte eine Zellzahlmenge zwischen  $1,88 \cdot 10^6$  / ml und  $25,63 \cdot 10^6$  / ml erreicht werden.

### 3.4 Materialien (Antikörper, Lösungen, Puffer, Reagenzien und Geräte)

#### Antikörper:

- HTA 1216 (Geschenk von Prof. K. Miyake, Department of Immunology, Saga Medical School, Japan)
- TLR 2.12 (Geschenk von Prof. K. Miyake, Department of Immunology, Saga Medical School, Japan)
- Goat-Anti-Mouse-FITC (Fluorescein Isothiocyanat (=FITC) konjugierter Ziege Anti-Maus polyklonaler AK vom Isotyp Ziege-Ig, BD Biosciences Pharmingen Nr.554001)
- CD14-PE (Phycoerythrin (=PE) konjugierter anti-human mAK vom Isotyp Maus-IgG<sub>2b</sub> Klon M $\phi$ P9, BD Biosciences Pharmingen Nr.345785)
- $\gamma$ 2a/ $\gamma$ 1 (Isotyp Kontrolle,  $\gamma$ 2a-FITC anti-mouse mAK vom Isotyp Maus-IgG<sub>2a</sub> Klon X39,  $\gamma$ 1-PE anti-mouse mAK vom Isotyp Maus-IgG<sub>1</sub> Klon X40, BD Biosciences Immunocytometry Systems Nr.340458)
- CD14-FITC (anti-human mAK vom Isotyp Maus-IgG<sub>2b</sub> Klon M $\phi$ P9, BD Biosciences Pharmingen Nr.345784)
- CD80-PE (anti-human mAK vom Isotyp Maus-IgG<sub>1</sub> Klon L307.4, BD Biosciences Pharmingen Nr.557227)
- MACS CD14<sup>+</sup> MicroBeads (anti-human mAK vom Isotyp Maus-IgG<sub>2a</sub>, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland, Nr. 130-050-201)

#### Lösungen:

- RPMI 1640 mit L-Glutamin (Invitrogen Life Technologies Gibco Nr.11875)
- Antibiotic-Antimycoticum (10000 U/ml Penicillin G; 10000  $\mu$ g/ml Streptomycin; 25  $\mu$ g/ml Amphotericin B) (Invitrogen Life Technologies Gibco Nr.15240)
- FCS (Invitrogen Life Technologies Gibco Nr.10108)

#### Puffer:

- PBS nach Dulbecco ohne Calcium und Magnesium (Invitrogen Life Technologies Gibco Nr.14190)
- FACS-Puffer (in aqua bidest gelöst: 10 mM HEPES pH 7,4 + 150 mM NaCl + 1 % BSA)
- FACS-S (FACS-Puffer + 5 % FCS) Lagerung bei 4 °C
- FACS-Flow (BD Biosciences Immunocytometry Systems Nr.342003)



Reagenzien:

- *LPS (Sigma L2654)*
- *Mäuse-Normal-Serum (Sigma S7273)*
- *INF $\gamma$  (Roche Nr.1040596)*
- *Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> (DynaL Biotech, Hamburg, Deutschland, Nr. 610.02)*
- *AmpliTa $\gamma$  Gold DNA Polymerase (Perkin-Elmer)*
- *SYBR Gold Lösung (Molecular Probes)*
- *SuperScript First-Strand Synthesis System (Gibco BRL, Cat 11904-018)*

Geräte:

- *Heraeus Megafuge 1.0R*
- *Hettich Universal (Tischzentrifuge)*
- *Heraeus-Christ Labofuge II*
- *Titertek Multiscan MCC/340 (ELISA Reader)*
- *Zeiss Axiovert 25 (Mikroskop)*
- *BeckmanCoulter EPICS XL MCL (Durchflußzytometer)*
- *Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9700 (PCR Cyclor)*
- *BioRad FluorS-Multiimager (PCR Reader)*

### 3.5 Untersuchungstechniken

Die Expression von hTLR2 und hTLR4 sowie von B7-1 auf zirkulierenden CD14<sup>+</sup> Monozyten wurde mit Hilfe einer Zwei-Farben-Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell separation, FACS) quantifiziert.

Die IL-12- und TNF $\alpha$ -Sekretion der Monozyten wurde nach ex-vivo Stimulation mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmt.

Desweiteren wurden die mRNS-Transkriptionslevel von hTLR4 und B7-1 nach MACS-Separation von CD14<sup>+</sup> Zellen mittels rt-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) untersucht.

#### 3.5.1 Durchflußzytometrie

Jede einzelne Zellpopulation ist gekennzeichnet durch spezifische Zelloberflächenantigene und unterschiedliche Streulichteigenschaften. Diese Merkmale sind die Grundlage für die phänotypische Charakterisierung und quantitativen Analyse der Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Dabei wird ein Argonlaser je nach Zellgröße, Oberflächenbeschaffenheit und Granularität der Zelle

in charakteristischer Weise als sogenanntes Streulicht abgelenkt und detektiert. Die von der jeweiligen Zelle determinierten Streulichteigenschaften werden in eine vorwärts und in eine seitwärts gerichtete Komponente differenziert, deren Lichtintensität zusammen mit der Fluoreszenz der Zelle gemessen wird. Der dabei ermittelte Fluoreszenzwert setzt sich aus der Eigenfluoreszenz der Zelle und der an Oberflächenantigenen gebundenen farbstoffgekoppelten Antikörper zusammen. Die detektierten Werte werden in Computerdaten umgerechnet, verarbeitet und als Punkt-Histogramme (engl.: dot-plot) dargestellt. Durch Bestimmung der Eigenfluoreszenz nicht-farbstoffgekoppelter Zellen lässt sich der Schwellenwert der Markierung festlegen.

#### 3.5.1.1 hTLR2 und hTLR4

Zur Charakterisierung und Quantifizierung der hTLR2- und hTLR4-Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten mittels Zwei-Farben-Durchflusszytometrie wurden diese Oberflächenantigene mit spezifischen polyklonalen Antikörpern markiert. Hierzu wurden zunächst  $4,0 \times 10^6$  Zellen (ausgezählt mittels einer Neubauer-Zählkammer) des polymorphnukleären-Zellpools in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (BD Falcon) überführt, abzentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT), anschließend der Überstand abgesaugt und das Zellsediment (engl.: Pellet) in 2 ml FACS-S resuspendiert.

Je Probe wurden folgende FACS-Röhrchen für die Färbung vorbereitet:

- 1) Negativkontrolle ohne jeglichen Antikörper
- 2) CD14-PE monoklonaler Antikörper zur Identifikation der CD14<sup>+</sup> Monozyten
- 3) Isotypkontrolle nur mit dem Primärantikörper (HTA 1216, TLR 2.12)
- 4) Isotypkontrolle nur mit dem Sekundärantikörper (Goat-Anti-Mouse-FITC)
- 5) hTLR2 Antikörper und sekundärer Antikörper (Goat-Anti-Mouse-FITC)
- 6) hTLR4 Antikörper und sekundärer Antikörper (Goat-Anti-Mouse-FITC)

Im ersten Schritt erfolgte die Markierung mit dem jeweiligen Primärantikörper.

Hierzu wurden in alle Röhrchen jeweils 250 µl Zellsuspension mit  $0,5 \times 10^6$  Zellen

überführt und anschließend 1,25 µg TLR 2.12 Antikörper in Röhrchen 5) und 1,25 µg HTA 1216 Antikörper in Röhrchen 6) pipettiert. Nach 60 minütiger Inkubation bei 4 °C im Dunkeln, Zentrifugation (2000 rpm, 5 min, RT) und einem Waschschrift mit je 3 ml FACS-S erfolgte die Markierung mit dem zweiten Antikörper.

Im zweiten Schritt wurde zu den 250 µl Zellsuspension, markiert mit dem ersten Antikörper, jeweils 0,5 µg Ziege-Anti-Maus-FITC, als Sekundäantikörper mit Farbstoffmarkierung, hinzupipettiert. Ausgenommen waren die Röhrchen 1), 2) und 3). Röhrchen 2) wurde in diesem Arbeitsgang mit 5 µl spezifischem CD14-PE Antikörper markiert.

Alle Arbeiten mit Fluoreszenz-markierten Reagenzien und die darauffolgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt.

Nach erneuter Inkubation für 30 min bei 4 °C im Dunkeln erfolgte ein Waschschrift mit 3 ml FACS. Zur Messung im Durchflußzytometer wurde das Zellpellet in 500 µl FACS-Flow resuspendiert und sofort ausgewertet.

Für die Detektion der markierten Fraktionen am Durchflußzytometer wurde die Erfassungs- und Analysesoftware „EXPO32 ADC“ eingesetzt.

Hierzu werden im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) die einzelnen Zellen entsprechend ihrer Größe, Granularität / Komplexität und durchgeführten Oberflächenantigenfärbung in einem zweidimensionalen Punkt-Histogramm oder einem Häufigkeitsverteilungs-Histogramm dargestellt. Der ermittelte Fluoreszenzwert summiert sich aus der Eigenfluoreszenz der Zelle und aus den mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern die an Oberflächenantigene jeder einzelnen Zelle binden. Je nach Intensität wird dann jede einzelne Zelle in einem Punkt-Histogramm dargestellt. Zehntausend Zellen wurden analysiert.

Bei der Auswertung werden die CD14-PE<sup>+</sup> Zellen in einem Analysefenster ausgewählt. Die PE markierten Zellen haben eine orange-gelbe Fluoreszenz und stellen sich in Kanal FL2 dar ( $\lambda = 560-590$  nm,  $E_{\max} = 530$  nm). Die FITC markierten Zellen, mit einer grünen Fluoreszenz, werden in Kanal FL1 gemessen ( $\lambda = 515-545$  nm,  $E_{\max} = 585$  nm). Mit den Negativkontrollen konnten unspezifische

Hintergrundfluoreszenzen und die Eigenfluoreszenzintensität ungefärbter Zellen beurteilt und als Schwellenwert eingestellt werden.

#### 3.5.1.2 B7-1

Parallel zu dem hTLR Versuchsansatz lief die Aufbereitung der restlichen PBMCs für die Durchführung des IL12 ELISA und der B7-1 Durchflusszytometrie.

Für die B7-1 Versuchsreihe wurden nach Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, RT) und Resuspension in 4 ml Medium (100 ml RPMI + 10 ml 10 % FCS + 1,1 ml 1 % Antibiotic-Antimycoticum) in einer 12-well Platte (Costar) 1 ml der Zell-Medium-Suspension vorgelegt. Die Stimulation erfolgte mit 100 ng LPS pro ml für 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Zur Resuspension der Zellen wurde die Platte für 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach konnte jedes well in ein 15 ml Falcon auspipettiert und zweimal mit 1 ml PBS unter vorsichtigem Ausschaben mit Zellkulturschabern (BD) gereinigt werden. Durch mikroskopische Kontrolle (Zeiss) wurde die vollständige Zellgewinnung überprüft.

Nach Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, RT) erfolgte die Auflösung des Zellsediments in 500 µl 10 % Mäuse-Normal-Serum und dann die Inkubation für 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Nach einem Waschschrift mit je 3 ml FACS-Flow wurde das Pellet in 310 µl FACS-Flow resuspendiert und je Probe drei FACS-Röhrchen vorbereitet:

- 1) Leerprobe ohne Antikörper
- 2) Isotypkontrolle mit 10 µl  $\gamma$ 2a/ $\gamma$ 1 Maus-IgG
- 3) Probe mit 10 µl CD14-FITC und 10 µl CD80-PE

In jedes der Röhrchen kamen 100 µl Zellsuspension mit anschließender Inkubation für 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Nach zwei weiteren Waschschriften mit je 3 ml FACS-Flow konnte das Pellet zur Messung am Durchflusszytometer mit 500 µl FACS-Flow resuspendiert werden. Auch hier zieht die Software für die Messung und anschließende Analyse jeweils genau 10000 Zellen heran.

### 3.5.2 ELISA

#### 3.5.2.1 IL-12

Um das humane Zytokin IL-12 quantitativ zu bestimmen wurde der Quantikine Kit von R&D Systems eingesetzt.

Nach Stimulation von 1 ml der PBMC-Medium-Suspension (Medium = 100 ml RPMI + 10 ml 10 % FCS + 1,1 ml 1 % Antibiotic-Antimycoticum) mit 100 U  $\text{INF}\gamma$  für zwei Stunden bei 37 °C 5 %  $\text{CO}_2$  und anschließender zweiter Stimulation mit 20 ng LPS für 22 Stunden bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ , konnte der Überstand abpipettiert, kurz anzentrifugiert (1000 rpm, 1 min, RT) und in einem neuen Eppendorfgefäß bei -80 °C eingefroren werden. Daneben wurde als Negativkontrolle 1 ml PBMC-Medium-Suspension 24 Stunden bei 37 °C 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert und nach Zentrifugation (1000 rpm, 1 min, RT) ebenfalls bei -80 °C bis zur Weiterverwendung im ELISA eingefroren.

Zur Durchführung des Sandwich-ELISA-Tests wurden die tiefgefrorenen Proben langsam auf Eis angetaut. Im nächsten Schritt kurz abzentrifugiert und mit dem Calibrator Diluent RD5 (1x) 1:3 verdünnt. Mit dem mitgelieferten rekombinanten IL-12 konnte eine Verdünnungsreihe von 500 pg/ml bis 7,8 pg/ml als Standard hergestellt werden. Das Calibrator Diluent RD5 (1x) diene als Nullstandardwert (0 pg/ml).

In jedes Well, der mit einem monoklonalen Antikörper gegen IL-12 beschichteten ELISA-Platte, wurden 200  $\mu\text{l}$  Probe oder Standard und 50  $\mu\text{l}$  Assay Diluent RD1F pipettiert, mit Klebefolie verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten drei Waschstritte mit je 300  $\mu\text{l}$  Waschpuffer pro Well zur Entfernung aller ungebundenen Substanzen. Um das gebundene IL-12 detektieren zu können, wurde dann in jedes Well 200  $\mu\text{l}$  IL-12 Conjugate (polyklonale AK gegen IL-12 konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase) hinzugefügt und erneut für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen konnte das im Sandwich-Prinzip markierte IL-12 mit je 200  $\mu\text{l}$  Substrate Solution für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln angefärbt werden. Dabei wird eine höhere Farbintensität erreicht je mehr Peroxidase zuvor binden konnte. Mit je 50  $\mu\text{l}$  Stop

Solution wurde die Farbreaktion beendet und die Platte innerhalb von 30 Minuten mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und 540 nm ausgewertet. Für alle Proben wurden Doppelwerte angefertigt und daraus der arithmetische Mittelwert gebildet.

#### 3.5.2.2 TNF- $\alpha$

Analog dem IL-12 ELISA wurde der Sandwich-ELISA für TNF- $\alpha$  ebenfalls mit einem Quantikine Kit von R&D Systems (Katalog Nummer DTA50) durchgeführt. Die Proben wurden 1:50 verdünnt und jeweils Doppelwerte bei 450 nm und 540 nm bestimmt.

#### 3.5.3 PCR

Zur Bestimmung der Transkriptionslevel von hTLR4 und B7-1 erfolgte zunächst die Isolierung von CD14<sup>+</sup> Monozyten mRNA und dann die Amplifizierung mittels reverse-transcription-PCR.

Dazu wurden die peripheren Blutmonozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation per Ficoll-Paque<sup>®</sup>, wie bereits unter Punkt 2.3 beschrieben, separiert und nach zweimaliger Spülung mit PBS eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in PBS resuspendiert. Danach erfolgte die Isolierung von CD14<sup>+</sup> Monozyten durch MACS CD14<sup>+</sup> MicroBeads<sup>®</sup> nach dem Protokoll des Herstellers in einem Magnet-Separator (Miltenyi Biotec). Zur darauffolgenden Extraktion der mRNA aus den CD14<sup>+</sup> Monozyten wurden Dynabeads<sup>®</sup> Oligo (dT)<sub>25</sub> ebenfalls nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

Im nächsten Zwischenschritt erfolgte die Umschreibung der mRNA in cDNA. Dazu war die Verwendung einer Reverse-Transkriptase, eines Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primers und eines dNTP-Gemisches notwendig. Die einzelnen Komponenten lagen uns als cDNA-Synthese Kit (SuperScript-Kit, Gibco) mit Arbeitsanweisungen des Herstellers vor.

Die Genexpression von hTLR4 und B7-1 konnte nun mittels semiquantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen werden. Dazu wurden die PCR Primer mittels MacVector 5.0 (Oxford Molecular Scientific) aus der bekannten cDNS-Sequenz des jeweiligen Gens entworfen und die Spezifität der Primer Sequenzen durch BLAST (= Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysiert. Für jedes Primerpaar wurden die Reaktionsbedingungen durch Findung der optimalen Annealing-Temperatur und Zykluszahl mittels Gradientenuntersuchungen und Zyklusstudien optimiert. In der folgenden Übersicht sind die Primersequenzen und die Genbank Accession Nummern der entsprechenden cDNS-Sequenzen sowie die spezifischen Annealing-Temperaturen und Zykluszahlen aufgeführt:

#### GAPDH

Accession Nummer: M33197

68 °C, 25 Zyklen

Sense-Primer AAGGTCCGAGTCAACGGATTTGG

Antisense-Primer AGGCATTGCTGATGATCTTGAGGC

#### TLR4

Accession Nummer: U88880

56 °C, 25 Zyklen

Sense-Primer TTTCCTGCAATGGATCAAGGACC

Antisense-Primer GGACACCACAACAATCACCTTTC

#### B7-1

Accession Nummer: NM005191

60 °C, 32 Zyklen

Sense-Primer AGTACAAGAACCGGACCATC

Antisense-Primer GGCGTACACTTTCCTTCTC

Die PCR-Reaktion erfolgte für jede cDNS-Probe als Doppelbestimmung. Dazu wurden die Proben zunächst mit AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase amplifiziert. Nach der Elektrophorese erfolgte die Inkubation des Agarose-Gels für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit SYBR-Gold Lösung (0,5 µl einer 100-fach konzentrierten

SYBR-Gold Lösung). Anschließend konnte die Fluoreszenz mittels Durchleuchtung mit ultraviolettem Licht bei einer Wellenlänge von 300 nm ausgewertet werden. Zur Quantifizierung der Proben wurde ein FluorS-Multiimager (BioRad) benutzt und die Fluoreszenz mittels Densitometrie-Analyse durch das Programm Quantity One Software (BioRad) gemessen.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm StatView<sup>®</sup> (SAS Institute Inc., Clay, USA) durchgeführt. Die normalverteilten Daten in der vorliegenden Arbeit sind in Form von Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Student's T-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein Unterschied von  $p < 0,05$  angesehen. Korrelationen der hTLR und B7-1 Oberflächenexpression mit den CFVR-Werten in Patienten früh nach der Herztransplantation wurden mit Hilfe paarweiser Korrelation bewertet.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Demographie der Herztransplantatempfänger

In der Patientengruppe, welche 1 bis 3 Jahre nach orthotoper Herztransplantation im Rahmen ihrer routinemäßigen Nachsorgeuntersuchung in unsere Studie eingeschlossen wurde (n = 38; 32 Männer, 6 Frauen; Alter  $57,3 \pm 15,7$  Jahre;  $16,2 \pm 10,7$  Monate nach HTx), litten 20 Patienten unter einer medikamentös behandelten arteriellen Hypertonie. Zum Studienzeitpunkt bestand allerdings unter der medikamentösen Therapie (ACE-Hemmer oder Kalziumantagonist) kein Unterschied bei den systolischen (normotensive Patienten:  $136 \pm 16$ , behandelte hypertensive Patienten:  $141 \pm 17$ ; p = 0,16) oder diastolischen (normotensive Patienten:  $74 \pm 9$ , behandelte hypertensive Patienten:  $83 \pm 11$ ; p = 0,11) Blutdruckwerten zwischen normotensiven Patienten und Patienten mit arteriellem Hypertonus. Bei 10 Patienten bestand ein nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus, ohne dass ein statistisch signifikanter Unterschied bei den Blutzuckerwerten zwischen Gesunden und Erkrankten gemessen werden konnte (Gesunde  $89 \pm 19$  mg/dl, Diabetiker  $121 \pm 32$  mg/dl; p = 0,10). Der mittlere Gesamtcholesterinwert lag bei  $187 \pm 23$  mg/dl und LDL-Cholesterin bei  $114 \pm 29$  mg/dl. 34 Patienten wurden zur Therapie der Hypercholesterinämie mit Statinen behandelt.

Als positive Kontrollgruppe wählten wir 10 Herztransplantatempfänger 6 bis 10 Jahre nach orthotoper Herztransplantation ohne Anzeichen für eine kardiale Transplantatvaskulopathie (8 Männer, 2 Frauen; Alter  $62,8 \pm 9,3$  Jahre;  $86,7 \pm 12,5$  Monate nach HTx). Diese Patienten zeigten eine normale endotheliale Funktion bis 48 Monate nach Transplantation und zeigten ebenfalls zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses im Rahmen der jährlichen Routine-Koronarangiographie keinen Anhalt für eine koronare Makroangiopathie.

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden nach einem auf Tacrolimus und Mycophenolatmofetil basierenden Protokoll immunsuppressiv behandelt. Keiner der untersuchten Patienten zeigte zum Zeitpunkt der Probengewinnung klinische Zeichen einer akuten oder chronischen Infektion oder akuter Abstoßungsepisoden

Bedeutung humaner Toll-like Rezeptoren bei der Abstoßung  
des transplantierten Herzens

nach Kriterien der „International Society for Heart & Lung Transplantation“ (ISHLT) Grad 1b oder höher. In einer angiographischen Kontrolluntersuchung 4 Wochen nach Transplantation konnte bei allen in diese Studie eingeschlossenen Patienten eine vom Spender übertragene Vaskulopathie ausgeschlossen werden.

Die nachfolgende Tabelle 2 fasst die klinischen und laborchemischen Eckdaten der Studienpopulation zusammen:

| Variable                    | Empfänger früh<br>nach HTx (n = 38) |                        | Empfänger spät<br>nach HTx (n = 10) | p-Wert |
|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|--------|
|                             | verminderte<br>CFVR (n=13)          | normale<br>CFVR (n=25) |                                     |        |
| Alter (Jahre)               | 54 ± 11                             | 58 ± 14                | 63 ± 9                              | 0.88   |
| Männlich                    | 11                                  | 21                     | 8                                   |        |
| Systolisch RR (mmHg)        | 139 ± 16                            | 138 ± 16               | 141 ± 19                            | 0.74   |
| Diastolisch RR (mmHg)       | 80 ± 9                              | 78 ± 11                | 83 ± 13                             | 0.50   |
| Kreatinin (mg/dl)           | 1.3 ± 0.2                           | 1.2 ± 0.3              | 1.6 ± 0.9                           | 0.12   |
| Glukose (mg/dl)             | 103 ± 21                            | 109 ± 28               | 115 ± 34                            | 0.54   |
| Cholesterin (mg/dl)         | 183 ± 16                            | 198 ± 24               | 196 ± 21                            | 0.68   |
| LDL-Cholesterin (mg/dl)     | 118 ± 23                            | 112 ± 28               | 127 ± 26                            | 0.23   |
| HDL-Cholesterin (mg/dl)     | 41 ± 5                              | 43 ± 3                 | 39 ± 6                              | 0.52   |
| Lipoprotein A               | 23 ± 10                             | 27 ± 9                 | 28 ± 9                              | 0.49   |
| C-reaktives Protein (mg/dl) | 0.23 ± 0.05                         | 0.21 ± 0.02            | 0.28 ± 0.03                         | 0.20   |
| Cytomegalievirus Status     | negativ                             | negativ                | negativ                             |        |
| HLA-Mismatch (%)            | 4.8 ± 0.7                           | 5.0 ± 0.4              | 5.3 ± 0.9                           | 0.64   |
| Patienten mit Statinen      | 11                                  | 23                     | 10                                  | 0.38   |

Tabelle 2: Klinische und laborchemische Charakteristiken der Studienpopulation  
(Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung oder als Anzahl dargestellt.)  
(CFVR = coronary flow reserve (koronare Flussreserve); HLA = humane  
Leukozytenantigene)

## **4.2 Mikrovaskuläre vasomotorische Funktion**

Die mikrovaskuläre vasomotorische Funktion wurde in den 38 Patienten früh nach der Herztransplantation untersucht. Um eine antransplantierte Dysfunktion auszuschließen, wurde die Endothelzell-Funktion bei allen Patienten vier Wochen nach Transplantation getestet, die Kontrollen 12 Monate (bei 20 Patienten) bzw. 36 Monate (bei den verbleibenden 18 Patienten) nach der Transplantation dienten zur Diagnostik einer sich neu entwickelten endothelialen Dysfunktion. Alle Patienten aus der späten Gruppe wurden zuletzt 48 Monate post transplantationem mit einer intrakoronaren Dopplermessung untersucht und zeigten keinen Anhalt für eine Endotheldysfunktion. Außerdem konnte zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie bei jedem Patienten aus der späten Gruppe eine koronare Makroangiopathie invasiv ausgeschlossen werden.

Dreizehn in der Gruppe früh nach Herztransplantation getestete Patienten (34 %) zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung eine verminderte koronare Flussreserve als Antwort auf Acetylcholin ( $1,29 \pm 0,19$ ). Bei den restlichen 25 Transplantatempfängern früh nach Transplantation konnten normale CFVR Werte zum Zeitpunkt der Studie bestimmt werden ( $3,27 \pm 0,81$ ;  $p < 0,001$ ).

## **4.3 Expression von Toll-like Rezeptoren auf zirkulierenden CD14<sup>+</sup> Monozyten**

### **4.3.1 Expression von hTLR2 und hTLR4 auf CD14<sup>+</sup> Zellen**

Die Expression von hTLR2- und hTLR4-Signalmolekülen des angeborenen Immunsystems auf zirkulierenden CD14<sup>+</sup> Monozyten wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Auswertung erfolgte in Dot-Plots, in denen jeder dargestellte Punkt einer mononukleären Zelle mit ihren typischen Streulichteigenschaften (je nach Größe, Form, Färbung) entspricht.

Exemplarisch wird das jeweils typische Verteilungsmuster der PBMCs bei Kontrollpersonen und HTx-Patienten, wie es während der Versuchsreihe am Durchflusszytometer beobachtet wurde, vorgestellt.

#### 4.3.1.1 Expansion von CD14<sup>+</sup>/hTLR2<sup>+</sup> Monozyten

Bei den hTLR2-Experimenten zeigte sich bei den Normalprobanden typischerweise eine der folgenden sehr ähnliche Quadrantenaufteilung: 6,9 % der Zellen befanden sich im LO (linker oberer Quadrant im Dot-Plot), 91,2 % im LU (linker unterer Quadrant), 0,2 % RU (rechter unterer Quadrant) und 1,7 % konnten im RO (rechter oberer Quadrant) gemessen werden. Bei den Patienten früh nach HTx hingegen zeichnete sich folgendes Bild ab: 1,3 % im LO, 90,1 % LU, 0,7 % RU und 7,9 % der PBMCs waren als hTLR2<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup> Monozyten im RO Quadranten.

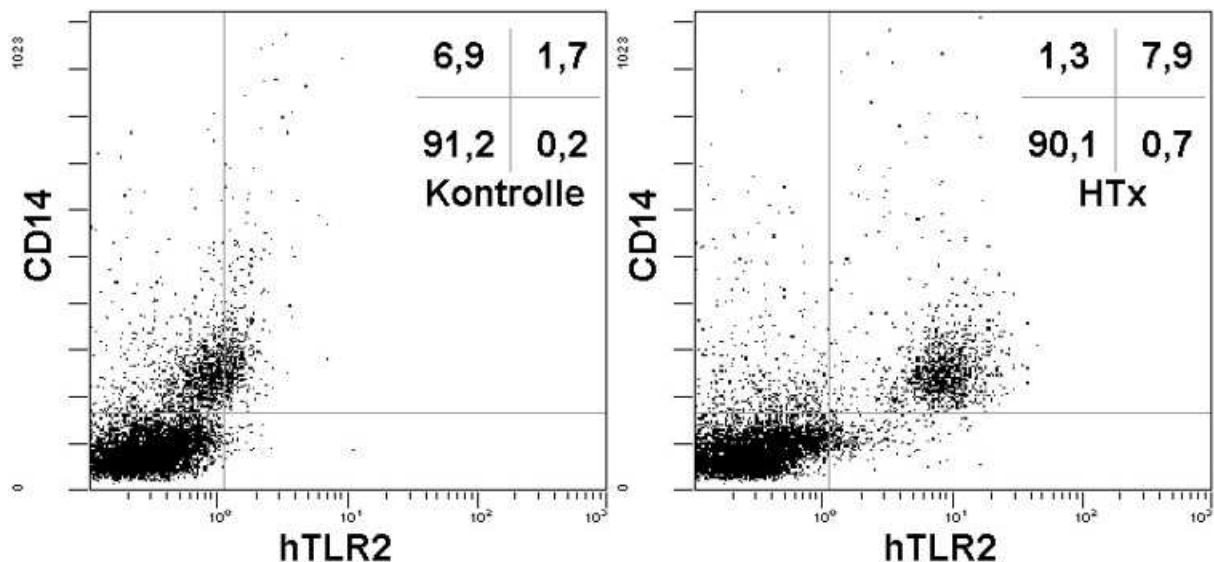


Abbildung 6: FACS Dot-Plot hTLR2 Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zum Kontrollkollektiv

Auf das gesamte Kollektiv der jeweiligen Gruppe gesehen konnte zunächst eine signifikant vermehrte Expansion von CD14<sup>+</sup>/hTLR2<sup>+</sup> Monozyten im Patientenkollektiv gegenüber dem Normalkollektiv festgestellt werden. Unter Einschluss aller prozentualen Werte der RU Quadranten aus dem Patientenkollektiv ergab sich der Mittelwert  $36,4 \pm 21,6$  % gegen  $13,0 \pm 5,4$  % aus dem Normalkollektiv. Der Signifikanzwert p lag bei  $< 0,005$ .

Betrachtet man aus der Gruppe der Transplantierten lediglich die Patienten früh nach dem Eingriff ( $39,0 \pm 23,0\%$ ) im Vergleich zu den Normalgesunden, ergab sich ebenfalls ein Signifikanzwert  $p < 0,005$ . Keine auf Signifikanz hindeutenden Werte ergab allerdings der Vergleich der frühen und späten ( $30,5 \pm 17,9\%$ ) Gruppe zueinander ( $p = 0,31$ ) (Abbildung 7).

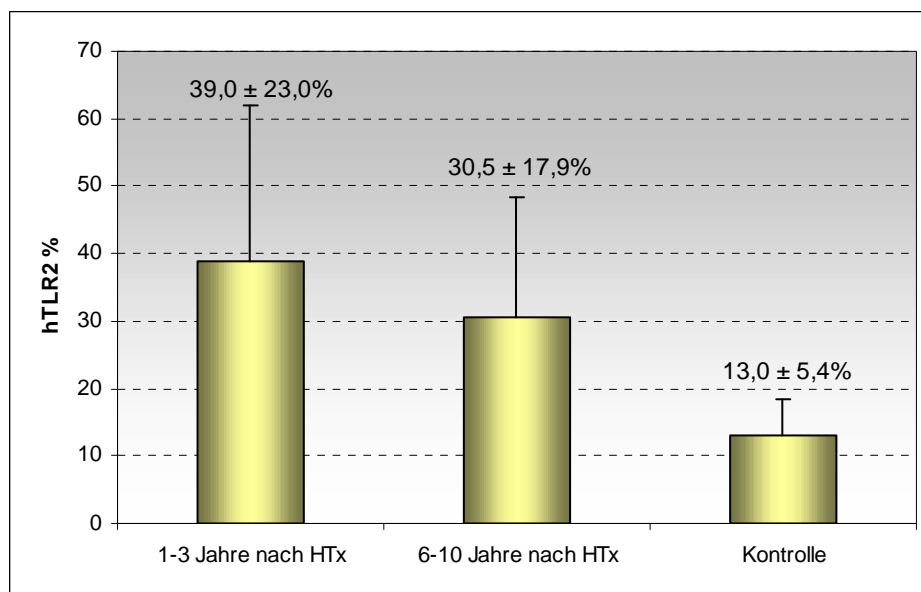


Abbildung 7: hTLR2 Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv (früh gegen Kontrolle:  $p < 0,005$ )

Durch weitere Aufspaltung der Patientengruppe früh nach Transplantation in ein Kollektiv mit endothelialer Dysfunktion ( $n = 13$ ) und ein Kollektiv ohne klinischen Anzeichen einer endothelialen Dysfunktion ( $CFVR > 2$ ;  $n = 25$ ) ließen sich folgende Werte gegenüberstellen:  $51,4 \pm 20,8\%$  und  $28,7 \pm 20,1\%$ ;  $p < 0,05$  (Abbildung 8).

Bedeutung humaner Toll-like Rezeptoren bei der Abstoßung  
des transplantierten Herzens

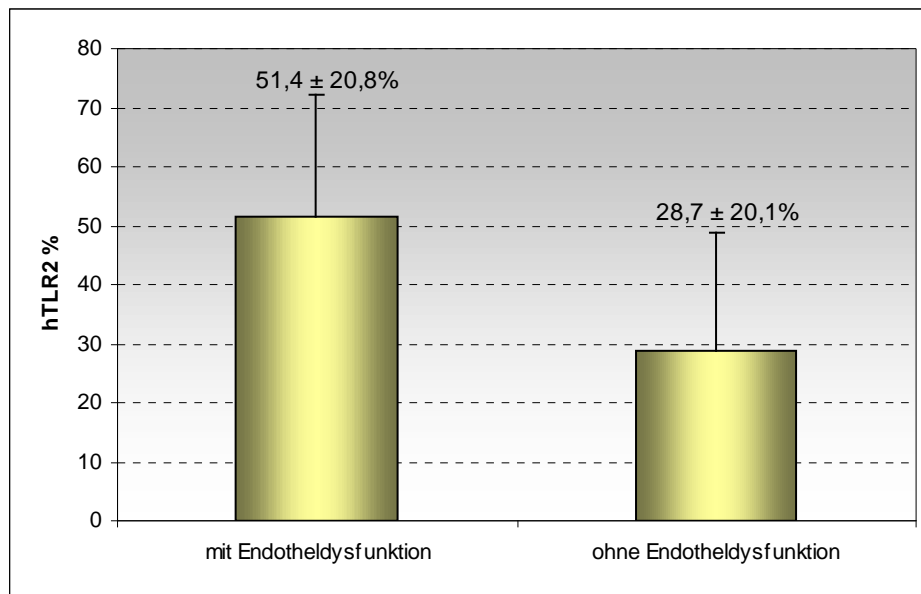


Abbildung 8: hTLR2 Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten bei Patienten früh nach Herztransplantation mit Endotheldysfunktion gegen Patienten ohne Endotheldysfunktion (p < 0,05)

#### 4.3.1.2 Expansion von CD14<sup>+</sup>/hTLR4<sup>+</sup> Monozyten

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten der hTLR4-Versuche ergab beispielhaft folgende Dot-Plots aus denen sich die Ergebnisse der hTLR4-Versuchsreihe ablesen lassen (Abbildung 9). Im Kontrollkollektiv: 5,0 % im LU, 93,6 % LL, 0,3 % RL und 1,1 % RU. Bei einem HTx-Patienten: 1,4 % im LU, 92,1 % LL, 0,6 % RL und 5,9 % RU.

Bedeutung humaner Toll-like Rezeptoren bei der Abstoßung  
des transplantierten Herzens

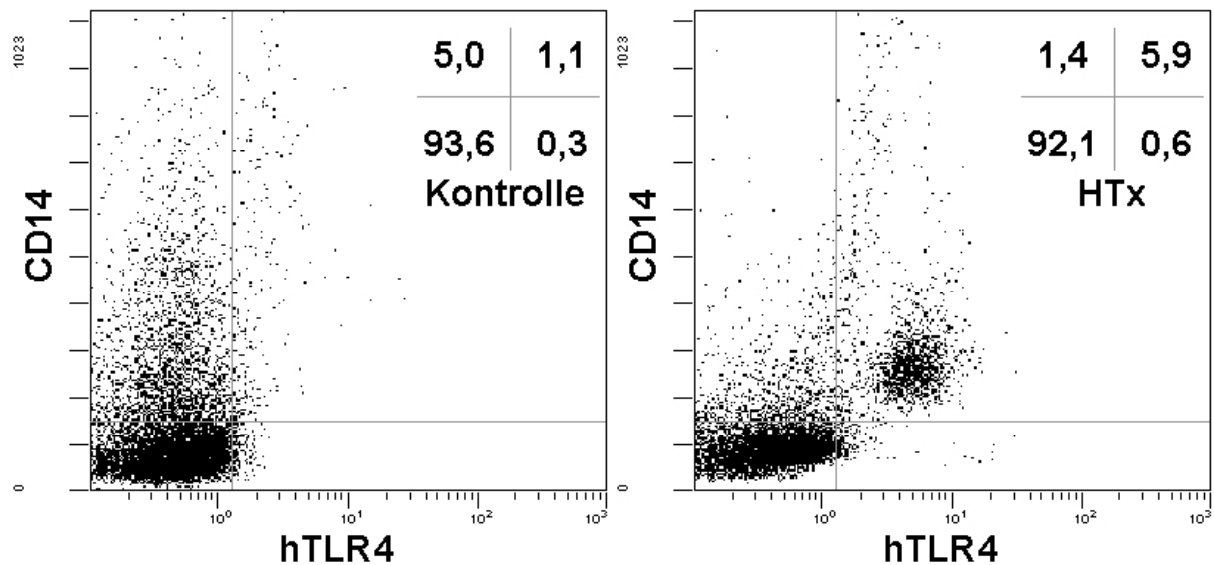


Abbildung 9: FACS Dot-Plot hTLR4 Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zum Kontrollkollektiv

Fasst man nun diese einzelnen Daten zusammen und wertet sie statistisch aus, erhält man Mittelwerte mit Standardabweichungen, die für die Herztransplantierten ( $35,2 \pm 18,4$  %) im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv ( $24,3 \pm 5,6$  %) zunächst keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,075$ ) zeigten. Allerdings legten die Daten und der Signifikanzwert eine genauere Aufschlüsselung parallel der hTLR2-Versuche bei der HTx Gruppe nahe.

Die Frequenz von peripheren CD14<sup>+</sup> Monozyten auf denen hTLR4 markiert werden konnte, lag dementsprechend in der Gruppe der Patienten früh nach der Transplantation bei  $39,5 \pm 20,9$  % gegenüber  $26,7 \pm 6,7$  % in der Gruppe spät nach Herztransplantation ( $p < 0,05$ ) und  $24,3 \pm 5,6$  % in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 10). Die Unterschiede in der Markierungsfrequenz zwischen der Kontroll- und der späten Patientengruppe waren nicht signifikant.

Bedeutung humaner Toll-like Rezeptoren bei der Abstoßung  
des transplantierten Herzens

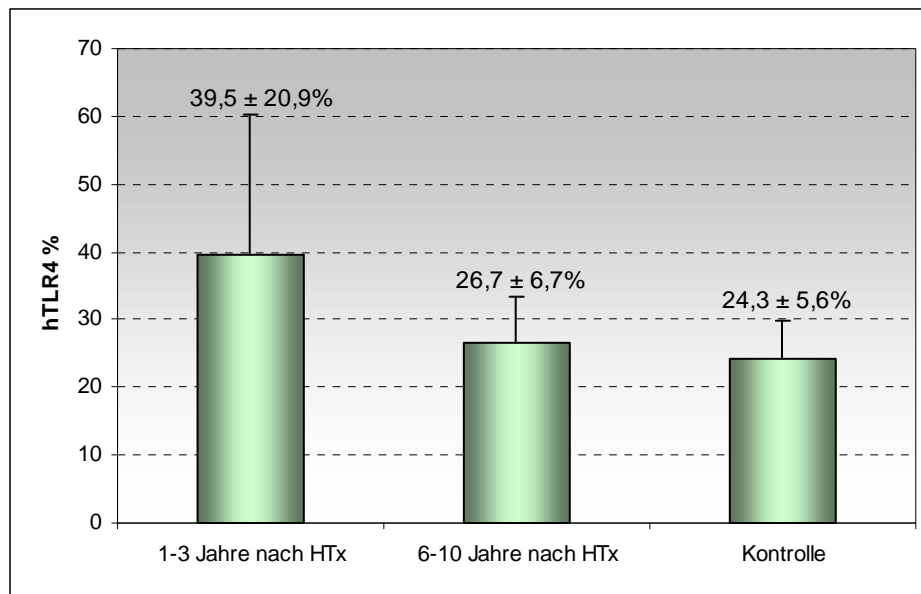


Abbildung 10: hTLR4 Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv (früh gegen Kontrolle:  $p < 0,05$ )

Teilt man analog den hTLR2 Ergebnissen das Patientenkollektiv früh nach Transplantation in eine Gruppe mit endothelialer Dysfunktion und in eine ohne dieses erste klinisch detektierbare Zeichen der Transplantatvaskulopathie auf, ließen sich folgende hochsignifikanten Unterschiede in der Expression von hTLR4 auf peripheren CD14<sup>+</sup> Monozyten eruieren. Bei Patienten mit Endotheldysfunktion liegt das hTLR4 Expressionslevel bei  $56,0 \pm 3,2$  % gegenüber Patienten ohne Endotheldysfunktion mit  $19,2 \pm 3,6$  % ( $p < 0,005$ ) (Abbildung 11).



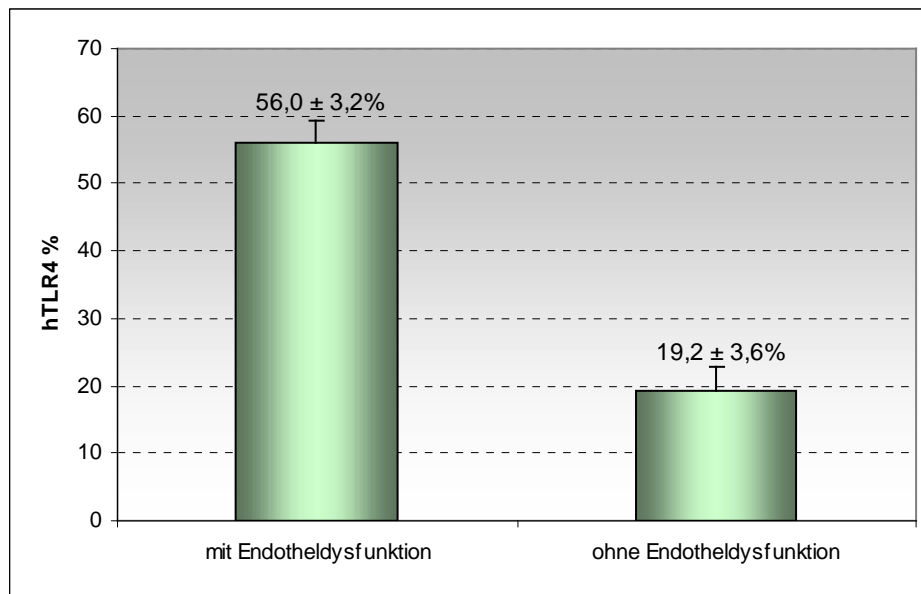


Abbildung 11: hTLR4 Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten bei Patienten früh nach Herztransplantation mit Endotheldysfunktion gegen Patienten ohne Endotheldysfunktion (p < 0,005)

Keinen signifikanten Unterschied ergab der Vergleich zwischen Patienten nach HTx mit normaler Endothelfunktion und Patienten spät nach der Herztransplantation beziehungsweise der Kontrollgruppe.

Somit zeigte sich, dass die endotheliale Dysfunktion bei Patienten früh nach einer Herztransplantation mit einer deutlich gesteigerten Expansion von CD14<sup>+</sup>/hTLR2<sup>+</sup>-Monozyten und CD14<sup>+</sup>/hTLR4<sup>+</sup>-Monozyten einhergeht.

#### 4.3.2 mRNS Transkriptionslevel für hTLR4 auf CD14<sup>+</sup> Zellen

In Analogie zu den Ergebnissen der Proteinexpression zeigten die mRNS Transkriptionslevel für hTLR4 auf CD14<sup>+</sup> Monozyten in Patienten früh ( $0,41 \pm 0,36$  RE (=relative Einheiten)) und spät ( $0,23 \pm 0,10$  RE) nach Herztransplantation keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zum Normalkollektiv ( $0,32 \pm 0,13$  RE). Jedoch konnten signifikant (p < 0,05) erhöhte mRNS Transkriptionslevel in der Subgruppe der Patienten früh nach Herztransplantation mit endothelialer Dysfunktion

( $0,79 \pm 0,36$  RE) im Vergleich zur Gruppe der Patienten früh nach Herztransplantation ohne endothelialer Dysfunktion ( $0,21 \pm 0,10$  RE) gefunden werden (Abbildung 12).

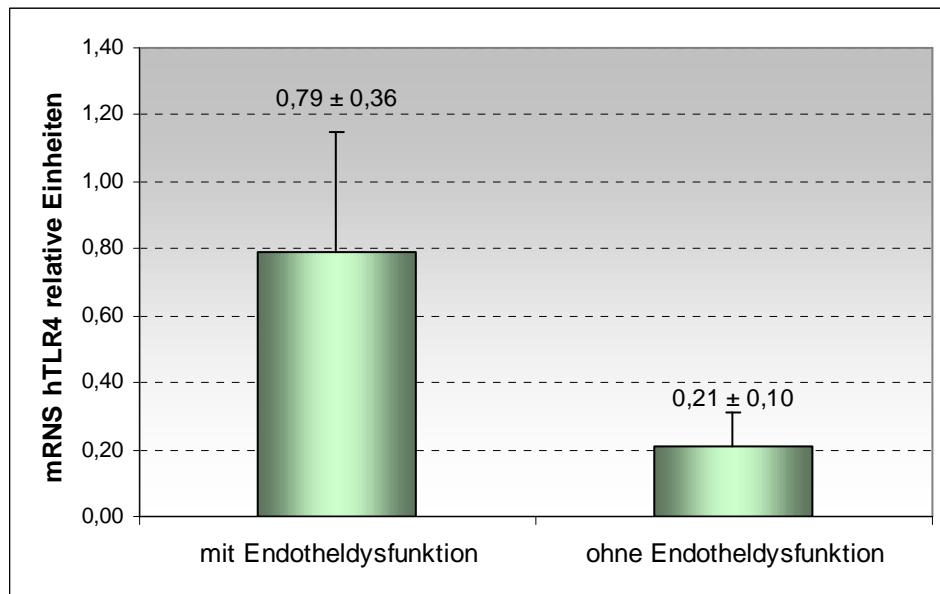


Abbildung 12: hTLR4 mRNA Expressionslevel bei Patienten früh nach Herztransplantation mit und ohne endothelialer Dysfunktion ( $p < 0,05$ )

#### 4.3.3 Korrelation von hTLR2 und hTLR4 mit der koronaren Flussreserve

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit zwischen dem prozentualen Anteil von hTLR2<sup>+</sup>/hTLR4<sup>+</sup> Zellen an der Gesamtpopulation von CD14<sup>+</sup> Monozyten und der koronaren Flussreserve (CFVR) stellten wir fest, dass die erhöhte Expansion von hTLR2- und hTLR4-Monozyten bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion früh post transplantationem negativ mit den Messwerten der kardialen Flussreserve korreliert. Der Korrelationskoeffizient  $r$  nach Pearson lag für hTLR2 bei  $-0,74$  ( $p = 0,007$ ; Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0,55$ ) (Abbildung 13) und für hTLR4 bei  $-0,73$  ( $p = 0,002$ ; Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0,54$ ) (Abbildung 14). Im Gegensatz dazu, konnten wir keine signifikante Korrelation zwischen der hTLR2 ( $r = -0,38$ ;  $p = 0,20$ ;  $r^2 = 0,15$ ) bzw. hTLR4 ( $r = -0,10$ ;  $p = 0,41$ ;  $r^2 = 0,01$ ) Expression und den CFVR Werten bei

Patienten mit normaler Endothelfunktion beobachten.

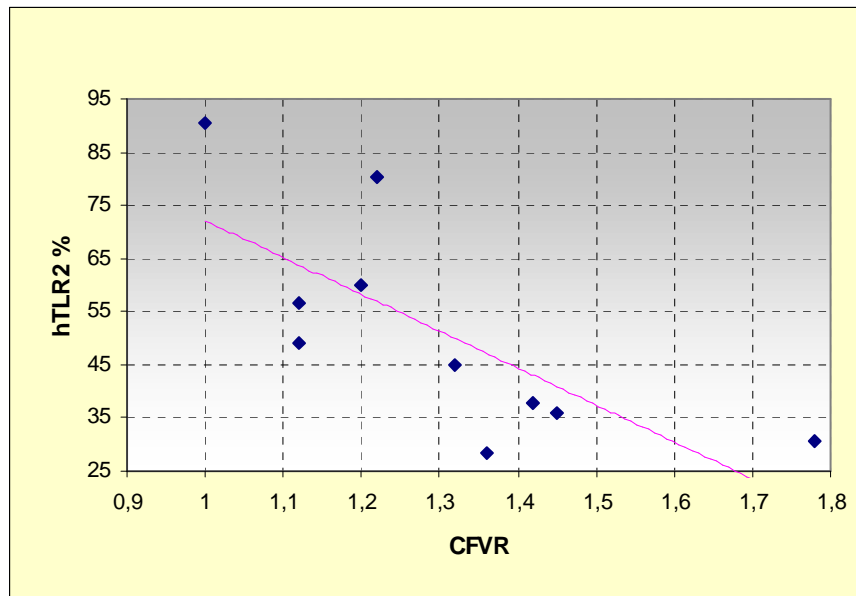


Abbildung 13: Negative Korrelation von hTLR2 Expression gegen koronare Flussreserve bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation

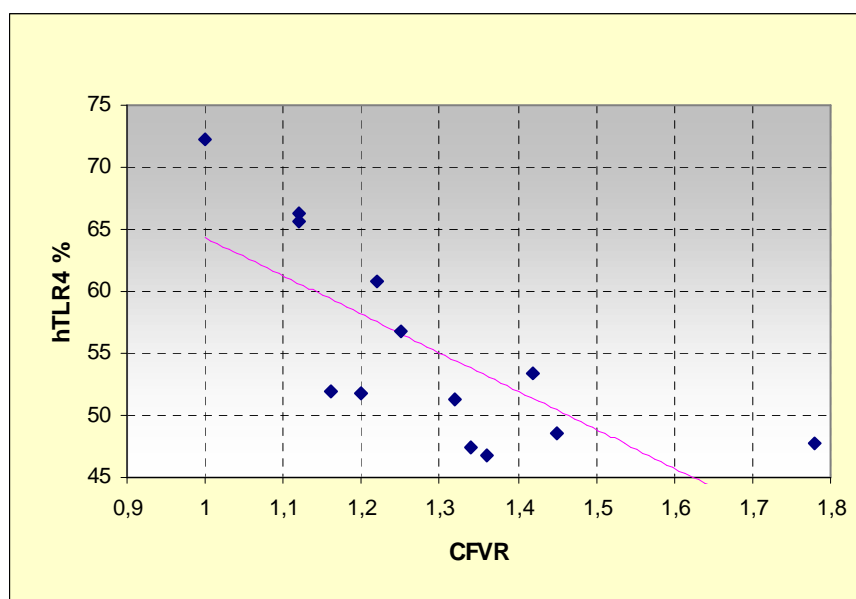


Abbildung 14: Negative Korrelation von hTLR4 Expression gegen koronare Flussreserve bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation

#### 4.4 Downstream-Effekte der Aktivierung von Toll-like Rezeptoren

Um die Downstream-Effekte einer Aktivierung von Toll-like Rezeptoren auf CD14<sup>+</sup> Zellen zu untersuchen, wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80) auf zirkulierenden Monozyten zytofluorographisch und mittels RT-PCR quantifiziert. Desweiteren bestimmten wir die Sekretionslevel des TH1-Inducerzytokins IL-12 und von TNF- $\alpha$  mittels ELISA.

##### 4.4.1 Expression von B7-1 auf CD14<sup>+</sup> Zellen

In der Kontrollgruppe konnte ein geringerer Anteil B7-1 positiver Monozyten an der Gesamtzahl der PBMCs in der Probe festgestellt werden. Beispielhaft ist in folgender Grafik (Abbildung 15) ein HTx-Patient mit 42,1 % B7-1 positiven Monozyten im Vergleich zu einem Normalprobanden mit 7,8 % B7-1 positiven Monozyten dargestellt.

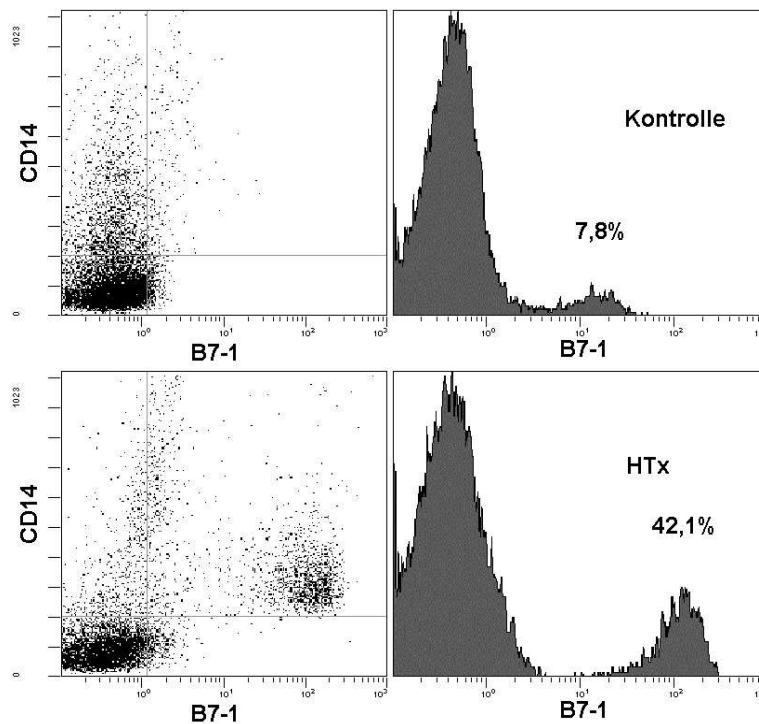


Abbildung 15: FACS Dot-Plot B7-1 Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zum Kontrollkollektiv

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Monozyten nach Herztransplantation eine vermehrte B7-1 Expression von  $28,7 \pm 16,2$  % in der Patientengruppe gegenüber  $3,1 \pm 4,2$  % in der Kontrollgruppe aufweisen. Dies entspricht einem Signifikanzwert von  $p < 0,001$ .

Erwartungsgemäß war somit die Expressionsfrequenz des kostimulatorischen B7-1 Moleküls auch in beiden Patientengruppen, getrennt von einander betrachtet, im Vergleich zur Kontrolle erhöht (früh:  $31,1 \pm 17,3$  %;  $p < 0,001$ ; spät:  $19,7 \pm 5,8$  %;  $p < 0,001$ ) (Abbildung 16).

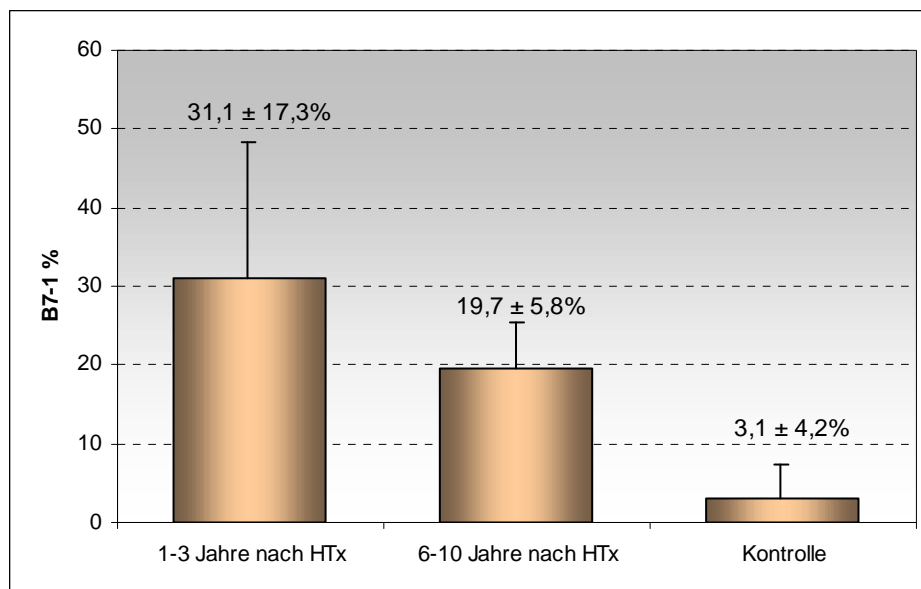


Abbildung 16: B7-1 Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv (früh gegen Kontrolle:  $p < 0,001$ )

Um die B7-1 Expression hinsichtlich der mikrovaskulären vasomotorischen Funktion früh nach der Transplantation weiter zu untersuchen, analysierten wir die Frequenz von CD14<sup>+</sup>/B7-1<sup>+</sup>-Monozyten in Patienten ein bis drei Jahre nach der Herztransplantation mit und ohne Endotheldysfunktion. Hierbei zeigte sich, dass in der Studiengruppe mit der pathologischen Endothelfunktion die Werte für B7-1

Bedeutung humaner Toll-like Rezeptoren bei der Abstoßung  
des transplantierten Herzens

signifikant höher waren, als bei Transplantierten mit normaler Funktion des Endothels ( $40,8 \pm 14,8\%$  gegen  $21,3 \pm 9,7\%$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 17) und bei Patienten spät nach Transplantation ohne Anzeichen einer Transplantatvaskulopathie ( $p < 0,05$ ).

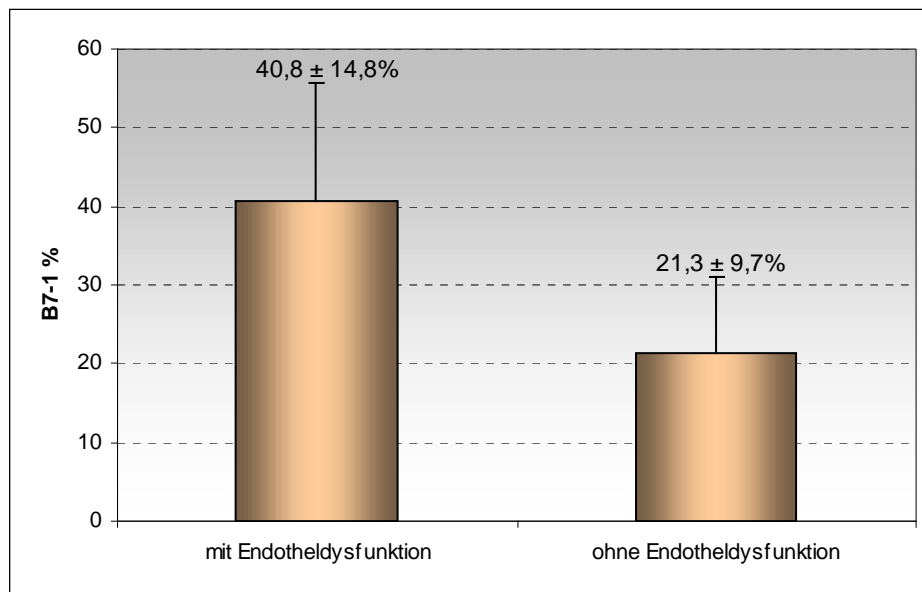


Abbildung 17: B7-1 Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten bei Patienten mit Endotheldysfunktion gegen Patienten ohne Endotheldysfunktion ( $p < 0,05$ )

#### 4.4.2 mRNS Transkriptionslevel für B7-1 auf CD14<sup>+</sup> Zellen

Analoge Ergebnisse erbrachte die Quantifizierung der B7-1 mRNS Expression. Es zeigte sich hinsichtlich der B7-1 mRNS Expression in zirkulierenden CD14<sup>+</sup> Monozyten kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten früh (0,13 ± 0,08 RE) und spät (0,15 ± 0,15 RE) nach Herztransplantation bzw. dem Kontrollkollektiv (0,12 ± 0,04 RE). Allerdings wiesen CD14<sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh nach Herztransplantation mit endothelialer Dysfunktion eine stärkere B7-1 mRNS Expression auf, als CD14<sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh nach Herztransplantation ohne endothelialer Dysfunktion (0,20 ± 0,09 gegen 0,09 ± 0,05 RE;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 18).

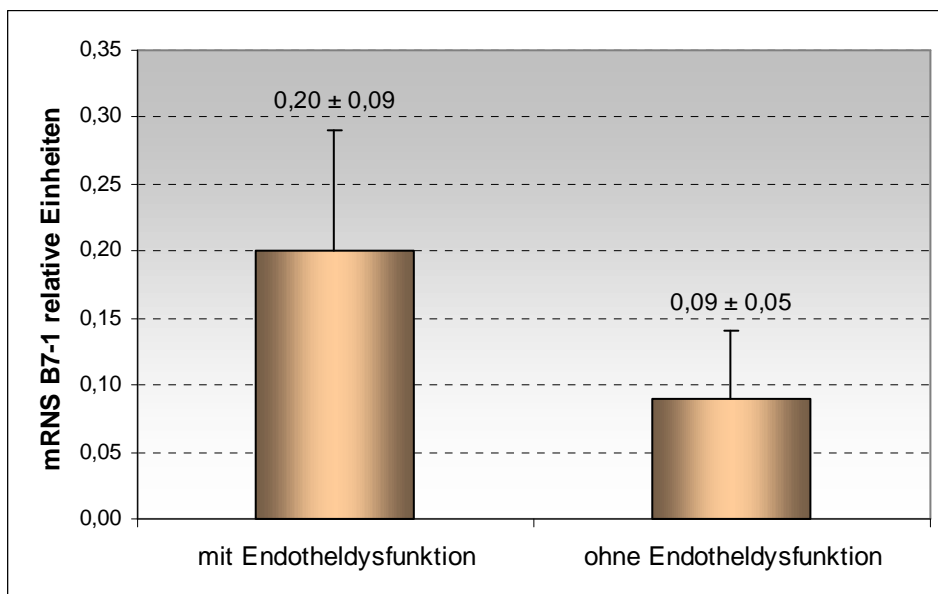


Abbildung 18: B7-1 mRNS Expressionslevel bei Patienten mit und ohne endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation ( $p < 0,05$ )

#### 4.4.3 Korrelation von B7-1 mit der koronaren Flussreserve

Die erhöhte Expansion von B7-1 exprimierenden Monozyten in Patienten mit Endotheldysfunktion früh nach der Transplantation korrelierte negativ mit den Werten der koronaren Flussreserve ( $r = -0,80$ ;  $p = 0,002$ ;  $r^2 = 0,63$ ) (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu, konnten wir keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der B7-1 Expression und CFVR Werten in Patienten mit normaler Endothelfunktion beobachten ( $r = 0,23$ ;  $p = 0,42$ ).

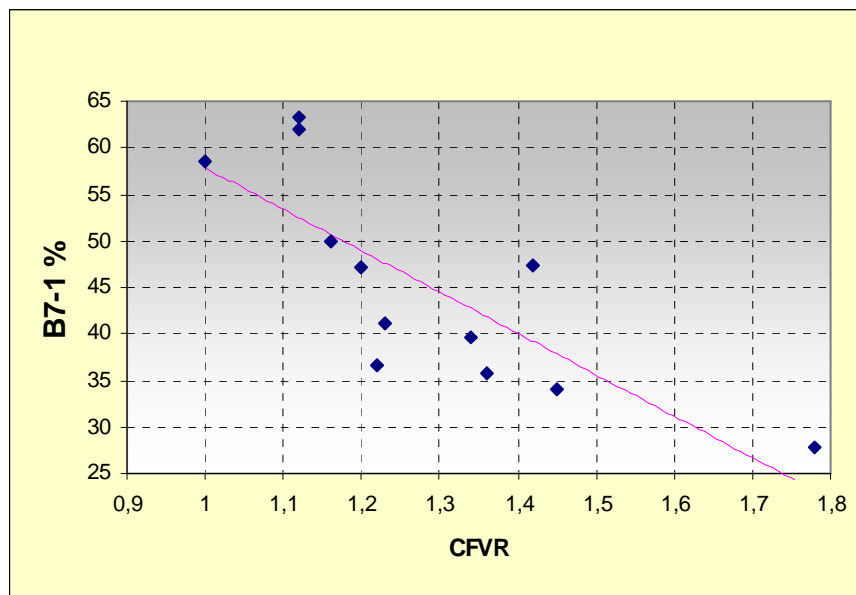


Abbildung 19: Negative Korrelation von B7-1 Expression gegen koronare Flussreserve bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation



#### 4.4.4 IL-12 Sekretion

Nach ex-vivo Stimulation der PBMCs wurde die IL-12 Expression im Zellüberstand bestimmt. Die Sekretion von IL-12 aus zirkulierenden Monozyten nahm dabei in der Patientengruppe früh nach HTx ( $26,1 \pm 3,7$  pg/ml) gegenüber den Normalprobanden ( $3,9 \pm 1,3$  pg/ml) signifikant ( $p < 0,001$ ) zu (Abbildung 20).

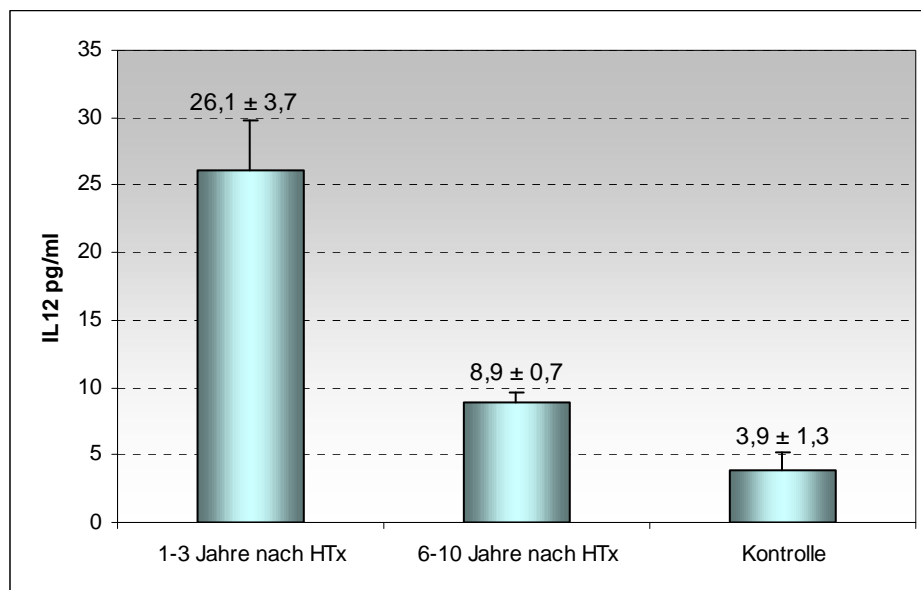


Abbildung 20: IL-12 Sekretion von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv  
(früh gegen Kontrolle:  $p < 0,001$ )

Darüber hinaus zeigten Herztransplantierte aus der frühen Gruppe mit Endotheldysfunktion signifikant höhere IL-12 Werte ( $32,4 \pm 5,3$  pg/ml) als Transplantatempfänger mit normaler Endothelfunktion ( $18,9 \pm 1,9$  pg/ml;  $p < 0,02$ ) (Abbildung 21).

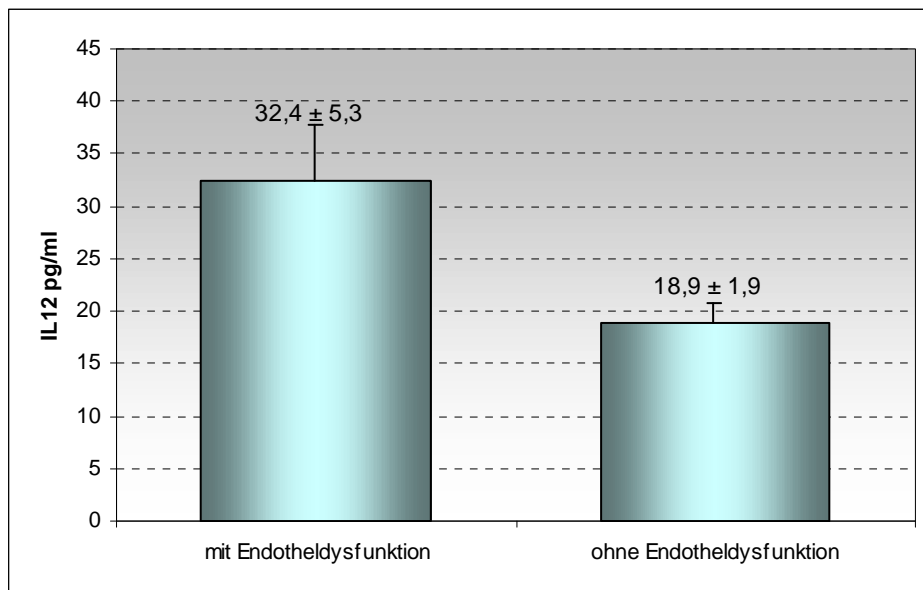


Abbildung 21: IL-12 Sekretion bei Patienten mit und ohne endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation ( $p < 0,02$ )

#### 4.4.5 TNF- $\alpha$ Sekretion

Als weiterer Downstream-Effekt der hTLR Expansion wurde die TNF- $\alpha$  Sekretion im Zellüberstand nach Stimulation bestimmt. Der Mittelwert lag in der Gruppe früh nach HTx bei  $3,1 \pm 0,18$  pg/ml und im Normalkollektiv bei  $1,1 \pm 0,1$  pg/ml. Mit  $p < 0,05$  konnte auch hier eine signifikante Differenz gezeigt werden (Abbildung 22).

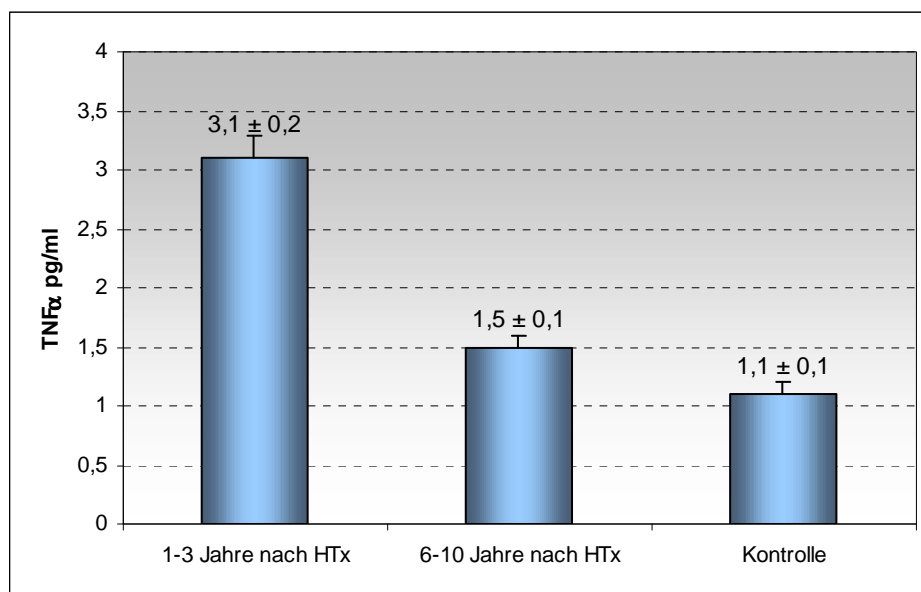


Abbildung 22: TNF- $\alpha$  Sekretion von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv  
(früh gegen Kontrolle:  $p < 0,05$ )

Betrachtet man nur die Gruppe der Patienten mit Endotheldysfunktion früh nach Transplantation, ergaben sich die Werte  $3,9 \pm 0,3$  pg/ml mit einem Signifikanzwert von  $p < 0,05$  gegenüber der Gruppe mit normaler Endothelfunktion (Abbildung 23).

Bedeutung humaner Toll-like Rezeptoren bei der Abstoßung  
des transplantierten Herzens

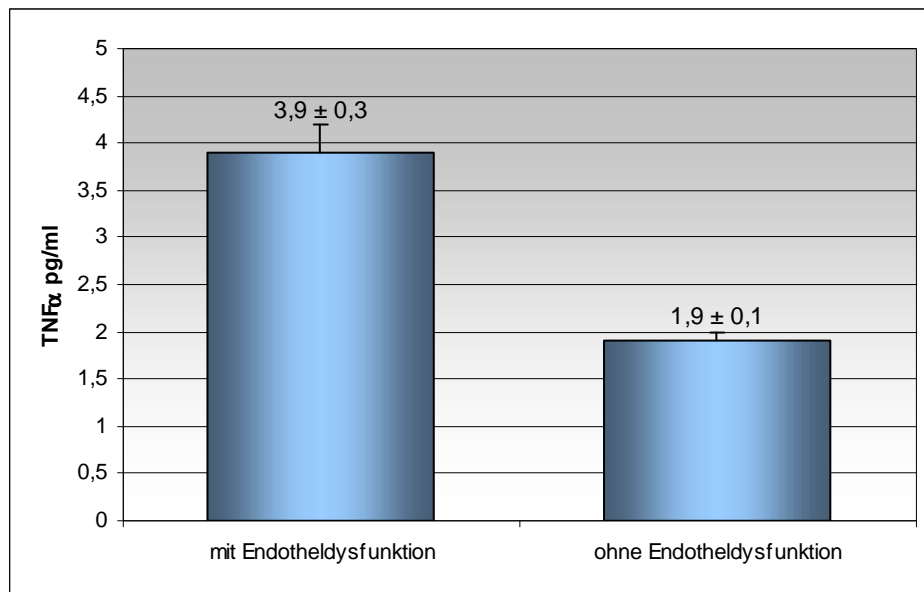


Abbildung 23: TNF- $\alpha$  Sekretion bei Patienten mit und ohne endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation ( $p < 0,05$ )

Die Zusammenschau unserer Ergebnisse liefert somit Hinweise, dass die vermehrte Expansion Toll-positiver Monozyten mit einer Hochregulation des kostimulatorischen Signalmoleküls B7-1 und einer vermehrten Sekretion des TH1-Inducerzytokins IL-12 sowie von TNF- $\alpha$  einhergeht.

## 5 Diskussion

Durch die Einführung von besseren Screeningverfahren und die Weiterentwicklung immunsuppressiver Medikamente, konnte die 1-Jahres-Überlebensrate nach Herztransplantation signifikant gesteigert werden. Die Langzeitüberlebensrate bleibt jedoch, neben den durch Immunsuppression induzierten lymphoproliferativen Erkrankungen und Malignomen, durch die chronische Transplantatabstoßung in Form einer Transplantatvaskulopathie weiterhin limitiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei der Transplantatabstoßung T-Zellen, insbesondere CD4<sup>+</sup> T-Zellen ursächlich beteiligt sind (65, 99, 112). Daneben sind aber der dominierende infiltrierende Zelltypus in Transplantaten während der Abstoßung Monozyten, was vermuten lässt, dass diese zur Abstoßung mit beitragen (44, 108, 112).

Zur Beurteilung einer Beteiligung angeborener Immunmechanismen an der Entwicklung einer chronischen Abstoßungsreaktion haben wir die Expression von hTLR2 und hTLR4 sowie die Freisetzung von IL-12 und TNF- $\alpha$  und die B7-1-Expression als typische nachgeschaltete Effekte einer TLR-Aktivierung in zirkulierenden CD14<sup>+</sup> Monozyten von Transplantatempfängern früh und spät nach allogener orthotoper Herztransplantation untersucht und mit einem gesunden Kontrollkollektiv verglichen.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie zeigen eine Erhöhung der hTLR2 und hTLR4 Rezeptorexpression auf peripher zirkulierenden CD14<sup>+</sup> Monozyten in Patienten nach Herztransplantation als Hinweis für eine wichtige Rolle des angeborenen Immunsystems bei Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation. Die vermehrte Expansion Toll-positiver Monozyten geht mit einer Hochregulation des kostimulatorischen Signalmoleküls B7-1 und einer vermehrten Sekretion des TH1-Inducerzytokins IL-12 sowie von TNF- $\alpha$  einher.

Insgesamt ist die Beteiligung des angeborenen Immunsystems an Abstoßungsreaktionen transplantiertter Organe und insbesondere an chronischen Abstoßungsformen noch nicht ausreichend untersucht. Manna et al. (79) zeigten, dass Stimulation mit allogenen und xenogenen Endothelzellen die Hochregulierung von mRNA für TLR4 in Monozyten bewirkt. Die fremden Endothelzellen dienen somit

als Stimulus zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Empfänger. Dabei wird unter anderem auch die Synthese des TH1-Inducerzytokins IL-12 verstärkt. Auch Ergebnisse unserer eigenen Arbeitsgruppe am Mausmodell belegen erhöhte Transkriptionslevel für mTLR4 und des kostimulatorischen Moleküls B7-1 bei akuter und chronischer Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation (84). Tatsächlich konnte hier auch ein signifikanter Unterschied in der Gruppe der chronischen Transplantatabstoßung bei ansonsten gleichen Bedingungen für die mTLR4 Transkriptionslevel bei den abgestoßenen Transplantaten im Vergleich zu den Isografts gefunden werden. Dies ist ein weiterer deutlicher Hinweis auf die Bedeutung von TLR4 bei der chronischen Transplantatabstoßung.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass TLR4 auch in anderen Organsystemen an Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation beteiligt ist und eine wichtige Rolle spielt. So zeigen Empfänger, welche heterozygot für eine Mutation im hTLR4 Gen sind und somit eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Endotoxin aufzeigen, eine verminderte akute Abstoßungsreaktion nach Lungentransplantation (95). Goldstein et al. beobachteten, dass eine Abstoßungsreaktion nach Hauttransplantation nach gezielter Störung von MyD88 nicht mehr auftrat. Hingegen hatte eine Unterbrechung des Signalwegs auf Ebene von TLR2 oder TLR4 keinen Einfluss (37). Auch nach Nierentransplantation konnte gezeigt werden, dass ein TLR4 Polymorphismus mit erniedrigtem Risiko für eine akute Abstoßungsreaktion und chronischer Transplantatvaskulopathie korreliert. Dies geht allerdings mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber schweren Infektionen einher (28). Eine mögliche Konsequenz aus den Beobachtungen bezüglich des TLR4 Polymorphismus wäre ein an diese Subgruppe angepasstes abgeschwächtes Immunsuppressions-Schema mit gleichzeitig intensivierten Präventivmaßnahmen gegen Infektionen, als denkbarer Ansatzpunkt zur Therapieoptimierung in dieser speziellen Kohorte. Bei Lebertransplantierten konnte die Arbeitsgruppe um Deng mit Hilfe eines zu unserer Studie vergleichbaren Versuchsansatzes eine mögliche Beteiligung des angeborenen Immunsystems über TLR2 und TLR4 an akuten Abstoßungsreaktionen zeigen. Eine signifikante Hochregulation der TLR2- und TLR4-Expression auf Monozyten in Patienten mit akuter Abstoßungsreaktion im

Vergleich zu Patienten mit stabiler Leberfunktion nach Transplantation wurde beobachtet. Hierbei gelang es auch mittels Steroiden die Expression von TLR in Patienten mit akuter Abstoßungsreaktion signifikant zu vermindern. Die Autoren dieser Studie postulieren daher, dass dies möglicherweise ein Mechanismus sein könnte, über den eine Steroidtherapie Abstoßungsreaktionen vermindert (26).

Die alleinige Aktivierung der angeborenen Immunantwort ist, wie bereits beschrieben, nicht ausreichend für die Entwicklung einer Transplantatabstoßung, da Transplantate in verschiedenen T-Zell-defizienten Modellen nicht abgestoßen werden. Jedoch kann das angeborene Immunsystem als wichtige Schnittstelle zwischen antigenabhängiger und antigenunabhängiger Immunantwort dienen (44). Die indirekte Aktivierung von naiven T-Zellen benötigt die gleichzeitige Anwesenheit von kostimulatorischen Signalen (zum Beispiel CD28 auf T-Zellen bindet B7-1 auf antigen-präsentierenden Zellen) für eine Ausdifferenzierung hin zu Effektorzellen (46, 83). In unserer Arbeit zeigen wir die Hochregulierung der B7-1 Expression und die erhöhte Sekretion von IL-12 und TNF- $\alpha$  in zirkulierenden Monozyten von Patienten nach HTx. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von Gullestad et al. (41) und Holm et al. (50). Für die klassische Arteriosklerose konnten bereits Lee et al. eine Assoziation zwischen IL-12 sowie B7-1 und der Ausbildung von Arteriosklerose zeigen. Eine tägliche Behandlung mit IL-12 führte im Mausmodell sogar zu einer beschleunigten Arterioskleroseentstehung (71). Ein weiteres Tiermodell zeigte eine deutliche Assoziation des kostimulatorischen B7-1 mit der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie (33). Erhärtet werden diese Daten aus dem Tiermodell durch eine Studie unserer eigenen Arbeitsgruppe am Menschen. Es konnte klar gezeigt werden, dass bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt sowohl die Expression von hTLR4 auf Monozyten, als auch die der nachgeschalteten Effekte (B7-1, IL-12) hochsignifikant erhöht sind (86).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten legen die Vermutung nahe, dass die Aktivierung angeborener Immunmechanismen auf antigenpräsentierenden Zellen die Entwicklung einer Endotheldysfunktion als ein frühes Zeichen der Transplantatvaskulopathie durch die Induktion von entscheidenden kostimulatorischen Molekülen wie B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86) mit beeinflussen

kann (64). Abgesehen davon, hat eine Aktivierung von TLR die Expression und Sekretion einer Vielzahl von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zur Folge. Diese können zu einer Rekrutierung von T-Lymphozyten in das transplantierte Organ und zur Aktivierung von Effektorzellen mit beitragen (111).

Unsere Beobachtung einer Hochregulation von TLR2 und TLR4 bei Patienten früh nach HTx mit Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, wird unterstützt durch Beobachtungen weiterer anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass Abstoßungsreaktionen auch nach HLA-Screening und Crossmatching sowie in Abwesenheit von „klassischen“ mikrobiellen Pathogenen ablaufen können. So kann das angeborene Immunsystem von endogenen Liganden, die durch den Transplantationseingriff selbst freigesetzt wurden (zum Beispiel nekrotisches Zellmaterial) stimuliert werden (31, 57, 58). Es ist denkbar, dass bei der Herztransplantation durch das chirurgische Trauma oder durch die Ischämierereperfusion TLR-Liganden akkumulieren, und dass diese durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems über hTLR2 und 4 zu der Entstehung der chronischen Abstoßungsreaktion nach einer Herztransplantation beitragen (57). Diese Hypothese findet Unterstützung in den Ergebnissen von Dybdahl et al. (29), welche die Freisetzung von hsp70 und die Hochregulierung von TLR2 und TLR4 auf zirkulierenden Monozyten für bis zu 43 Stunden nach offener Herzchirurgie beschreiben. Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte indirekt eine hsp60-abhängige Hochregulation von TLR4-Rezeptoren auf peripher zirkulierenden Monozyten bei der klassischen Arteriosklerose nachweisen (86). Desweiteren folgerten Tsoulfas et al. (122) durch Untersuchung an einem Lebertransplantationsmodell, dass mehrere Komponenten des TLR-Signalübertragungsweges aktiviert sind, wenn Schäden durch Ischämie bzw. Reperfusion induziert werden. Auch Johnson et al. (56) und Li et al. (74) belegen mit ihren Untersuchungen mit Heparansulfat die These der Freisetzung von endogenen Liganden z.B. aus geschädigtem Gewebe.

Trotzdem bleibt es, basierend auf unseren Daten, unklar, warum ein Patient eine endotheliale Dysfunktion entwickelt, und ein anderer dies nicht tut. Diesbezüglich konnten Palmer et al. in einem Kollektiv von Lungentransplantierten zeigen, dass Transplantatempfänger, welche heterozygot für einen von zwei funktionellen



Polymorphismen des TLR4 waren und damit mit einer verminderten Empfindlichkeit auf Endotoxin einhergehend, eine abgeschwächte akute Abstoßungsreaktion nach Transplantation zeigten (94, 95). Diese akuten Abstoßungsereignisse wiederum stellen einen essentiellen Einflussfaktor auf das Langzeitergebnis nach Lungentransplantation dar. Bereits ein einziger Vorfall steigert das Risiko einer chronischen Abstoßungsreaktion um über 10 % (42). Die Bedeutung von Polymorphismen des TLR4 Rezeptors für die Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen wurde von Kiechl et al. (63) in einer epidemiologischen Studie an 810 Personen demonstriert. Desweiteren konnte in TLR4 defizienten Mäusen gegenüber Wildtypmäusen nach LPS Stimulation die Entstehung von neointimalen Hyperplasien um 60 % reduziert werden. Dies verdeutlicht, dass die Aktivierung von TLR4 zur Vergrößerung von neointimalen Formationen führt (126), welche wiederum als Nährboden der Arteriosklerose angesehen werden (115). Auch Michelsen et al. (87) konnten eine Beteiligung von TLR4 und MyD88 bei der Entstehung von Arteriosklerose in einem Mausmodell bestätigen. Entsprechend unserer Versuche stellten sie erniedrigte Blutspiegel des proinflammatorischen IL-12 in Mäusen ohne TLR4 bzw. MyD88 fest. Desweiteren war das Fehlen von TLR4 oder MyD88 mit Veränderungen in der arteriosklerotischen Plaquezusammensetzung assoziiert. Diese lassen eine höhere Stabilität des Plaquephenotyps vermuten. Michelsen et al. weisen damit auf eine pathophysiologische Verbindung zwischen angeborenem Immunsystem, Entzündungsreaktion und der Genese der Arteriosklerose hin.

Ein anderes Modell deutet auf eine entscheidende Rolle des TLR Signal-Adapter-Proteins MyD88 bei der Transplantatabstoßung (37) hin. Li et al. (73) konnten zeigen, dass der TLR vermittelte MyD88-abhängige NF- $\kappa$ B Signalübertragungsweg eine wichtige Rolle bei myokardialen Ischämie-/ Reperfusionsschäden spielen könnte. Denkbar wäre somit eine Triggerung einer angeborenen Immunantwort im Empfängerorganismus durch Explantation, Ischämiezeit (Transport, Operationsdauer) sowie durch die Organimplantation selbst. Die von Li et al. herausgearbeitete MyD88-abhängige TLR-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung könnte somit ein therapeutisches Ziel zur Protektion des Myokards vor Ischämie-/ Reperfusionsschäden darstellen. Gleichzeitig berichtet die Arbeitsgruppe um Li, dass

TLR2-vermittelt ein alternativer Signalübertragungsweg über die Aktivierung von PI3K/Akt die Kardiomyozytenüberlebensrate begünstigt und die ischämiebedingte Myozytenapoptose inhibiert wird (32, 40, 80).

Aber auch Variationen im CD14 Co-Rezeptor für Toll-like Rezeptoren kommen als mögliche Variable, welche die Entstehung und Ausdehnung von atheromatösen Plaques in bestimmten Populationen beeinflussen in Frage (08). Darüber hinaus konnten Kim et al. (64) zeigen, dass es durch Blockade der kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 möglich ist, eine bereits initiierte chronische Abstoßungsreaktion zu modifizieren. Er postuliert, dass die chronische Abstoßungsreaktion des Herzens das Ergebnis der andauernden Immunstimulation ist und nicht aufgrund einer durch die Transplantation einmal angestoßenen irreversiblen Immunkaskade abläuft.

Betrachtet man überblickend die aktuelle Literatur, so gibt es Hinweise, die auf die Beteiligung sowohl lokaler, als auch systemischer Entzündungsreaktionen bei der pathophysiologischen Entstehung von verschiedenen kardiologischen bzw. kardiovaskulären Erkrankungen hindeuten. Durch unsere Arbeit an Monozyten konnten wir zeigen, dass hTLR2 und hTLR4 und die nachfolgenden Zytokine bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion als erstes Anzeichen einer chronischen Transplantatabstoßung signifikant erhöht sind.

Ein hypothetisch limitierender Einflussfaktor auf unsere Studie stellt die mögliche Assoziation der chronischen Abstoßungsreaktion mit Infektionen dar. So ist es denkbar, dass bakterielle oder virale Infektionen die hTLR Expression triggern und somit die Entzündungsreaktionen, die letztendlich zur chronischen Abstoßungsreaktion führen, katalysieren könnten. Zu beachten ist hier jedoch, dass in der akuten Phase nach dem Eingriff alle transplantierten Patienten prophylaktisch antibiotisch abgedeckt werden. Eine Differenz in den Patientengruppen ergibt sich somit nicht, so dass dieser Aspekt keinen Einfluss auf die Validität unserer Ergebnisse hat. Problematisch bleiben eher mögliche latente Phasen von leichten akuten Infektionen im Langzeitverlauf, welche die Patienten selbst symptomatisch therapieren und somit nur schwer in Versuchsprotokollen zu erheben sind. Diese

lassen sich auch kaum anhand gängiger laborchemischer Parameter verifizieren. In unserem Versuchsansatz differierte das CRP zwischen den einzelnen Gruppen nicht. In Zusammenschau könnte aber eingeworfen werden, dass diese latenten Infektionsphasen möglicherweise dennoch eine Rolle bei der Aktivierung von hTLR spielen könnten. Gegen dieses Argument sprechen aber auch die Ergebnisse aus den diesbezüglich besser kontrollierbaren Tiermodellen.

Weiteren Forschungsbedarf gibt es auch bei der Frage, ob die von uns gezeigte erhöhte hTLR Expression auf Monozyten, Ursache oder Folge der endothelialen Dysfunktion ist. So ist es denkbar, dass Monozyten durch bestimmte Liganden aktiviert werden und somit eine Kettenreaktion anstoßen. Andererseits ist es ebenso möglich, dass diese Monozyten durch zuvor aktivierte Immunzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten über Zytokine stimuliert werden. Wahrscheinlich ist, ein Zusammenspiel zwischen lokalen und systemischen Ereignissen, die sich gegenseitig potenzieren.

Auch wäre ein Versuchsansatz mit der Untersuchung von Monozyten aus der koronar-venösen Strombahn anstatt den peripher zirkulierenden Monozyten erstrebenswert, um ein noch genaueres Bild der lokalen immunologischen Gegebenheiten im Transplantat zu erhalten. Systemische Einflussfaktoren wie latente Infektionen wären hierbei eventuell geringer ausgeprägt.

Ein weiterer Denkansatz liegt in dem Zusammenspiel der verschiedenen hTLR begründet. So wird vermutet, dass bei der Transplantat-Abstoßungsreaktion mehr als nur ein TLR beteiligt ist und das Zusammenspiel mit entscheidet. Goldstein et al. (37) fanden heraus, dass in Abwesenheit von TLR2 die Zeit bis zur Abstoßungsreaktion von allogenen Hauttransplantaten gering verzögert ist. Die komplexen Interaktionen zwischen den TLR, dem Allograft und den Zytokinen bleiben unverstanden. Sie beziehen multiple Liganden und verschiedene Rezeptoren, die alleine oder im Zusammenspiel untereinander agieren, mit ein. Li et al. (74) machten mit ihren Forschungen darauf aufmerksam, dass nekrotische Zellen, aber nicht apoptotische Zellen, über TLR2 den NF- $\kappa$ B-Signalübertragungsweg aktivieren. Außerdem fanden sie heraus, dass die Koexpression von TLR6 diese Aktivierung noch potenzieren

kann. Es ist also möglich, dass erst das Zusammenspiel eines Repertoires von TLR eine entzündliche Reaktion induziert.

Abseits von dem TLR-System scheinen auch andere Systeme wie z.B. das Komplementsystem entscheidenden Einfluss auf die immunologischen Abläufe zu nehmen. Auch eine regulatorische Verbindung des Komplementsystems mit dem TLR-System ist denkbar (43).

Sowohl aus Tiermodellen, als auch aus klinischen Untersuchungen lässt sich also eine erst seit einigen Jahren bekannte Beteiligung des angeborenen Immunsystems an der Entstehung einer Transplantat-Abstoßung ableiten. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems nach Organtransplantation ist ein komplexer Prozess. Offen bleibt, ob die Beeinflussung von TLR oder deren weiterer intrazellulären Signalkaskade einen günstigen Effekt auf die Transplantat-Abstoßung zeigen wird. Eine Gefahr könnte beispielsweise auch eine erhöhte Infektanfälligkeit nach Immunmodulation von TLR sein, was unter der nötigen Immunsuppression deletäre Folgen haben könnte (45). Dennoch kann das weitere Verständnis der Mechanismen und Interaktionen um die Gruppe der TLR beziehungsweise der von ihnen initiierten Signalwege möglicherweise zur besseren Kontrolle der Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation beitragen.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse eine signifikante Assoziation zwischen hTLR2 und hTLR4 Expression auf zirkulierenden Monozyten und einer Herztransplantation. Diese erhöhte Rezeptorexpression ist verbunden mit typischen nachgeschalteten Effekten der hTLR Aktivierung (B7-1, IL-12, TNF- $\alpha$ ). Diese Ergebnisse könnten erste Beweise dafür liefern, dass die Aktivierung von hTLR ein Teil der Kaskade ist, welche die erworbenen Immunreaktionen triggert, die essentiell für die Entstehung von Abstoßungsreaktionen in dem transplantierten Organ sind.

Durch den Querschnittscharakter und die geringe Größe unserer Studie ist es nötig, Serienstudien in individuellen Patienten und Korrelationen mit klinischen oder zumindest angiographischen Ergebnissen in einer größeren Anzahl von Patienten zu erheben, bevor hTLR2 und hTLR4 letztendlich als ein potentieller Kandidat bei der Suche nach neuen Zielen zur Verhinderung der chronischen Abstoßungsreaktion angesehen werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit soll der Stellenwert des unspezifischen angeborenen Immunsystems im Rahmen der chronischen Transplantatabstoßung nach allogener orthotoper Herztransplantation näher dargestellt werden.

Humane Toll-like Rezeptoren initiieren Signalübertragungswege beispielsweise über ihr Signaladaptermolekül MyD88 und induzieren damit die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Dies startet in antigenpräsentierenden Zellen einen Reifungsprozess, welcher in Expression von kostimulatorischen Molekülen wie B7-1 und Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-12 und TNF- $\alpha$  mündet. Dieses pro-inflammatorische Milieu kann zur Aktivierung der erworbenen Immunantwort mit Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen zu TH1-Lymphozyten führen.

Als ersten Hinweis einer möglichen Beteiligung des Toll-Rezeptorsystems an der Aktivierung von Effektorfunktionen des angeborenen Immunsystems haben wir die Regulation von hTLR2 und hTLR4 sowie die daraus resultierende Expression von B7-1 auf peripher zirkulierenden CD14<sup>+</sup> Monozyten in Patienten nach Herztransplantation untersucht. Im Vergleich zu Patienten 1-3 Jahre nach Herztransplantation ohne Endotheldysfunktion, als frühes klinisch detektierbares Zeichen einer beginnenden Transplantatvaskulopathie, weisen zirkulierende Monozyten von Transplantatempfängern mit Endotheldysfunktion eine erhöhte Expression von hTLR2 und hTLR4 auf. Auch das kostimulatorische B7-1 Molekül und die nachgeschalteten freigesetzten Zytokine IL-12 und TNF- $\alpha$  sind bei der Patientengruppe mit endothelialer Dysfunktion signifikant erhöht.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine Erhöhung der hTLR2 und hTLR4 Rezeptorexpression in Patienten nach Herztransplantation und weisen auf eine neue Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Entstehung der chronischen Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit fanden Eingang in eine Veröffentlichung von Priv.Doiz. Dr. Heiko Methe in der Fachzeitschrift „Transplantation“ (2004 Nov 15;78(9)) unter dem Titel „Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation“.

## 7 Literaturverzeichnis

**01. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, Miyake K**

Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages

J Immunol 2000,164:3471-3475

**02. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A**

Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2

Science 1999,285:736

**03. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C**

Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product.

Cell 1985,42:779-789

**04. Anderson KV**

Toll signaling pathways in the innate immune response

Curr Opin Immunol 2000,12:13-19

**05. Arbustini E, Roberts WC**

Morphological observations in the epicardial coronary arteries and their surroundings late after cardiac transplantation (allograft vascular disease)

Am J Cardiol 1996,78:814-820

**06. Ardehali A, Drinkwater DC, Laks H, Drake TA**

Cardiac allograft vasculopathy

Am Heart J 1993,126:1498-1502

**07. Areschoug T, Gordon S**

Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands.

Contrib Microbiol 2008,15:45-60

**08. Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Jeffery S, Kaski JC**

CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events?

Heart 2004,90:983-988

**09. Bach FH, van Rood JJ**

The major histocompatibility complex – genetics and biology

N Engl J Med 1976,295:806-813

**10. Barnard CN**

The operation

S Afr Med J 1967,41:1271-1274

**11. Barnard CN**

Human heart transplantation. The diagnosis of rejection

Am J Cardiol 1968,22:811-819

**12. Barton GM, Medzhitov R**

Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors.

Curr Opin Immunol 2002,14:380-383

**13. Billingham ME**

Histopathology of graft coronary disease

J Heart Lung Transplant 1992,11:38-44

**14. Billingham ME**

The pathologic changes in long-term heart and lung transplant survivors

J Heart Lung Transplant 1992,11:252-257

**15. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stählin H**

Effects of new anti-lymphocytic polypeptide Cyclosporin A in animals

Immunology 1977,32:1017-1025



**16. Borel JF**

Immunological properties of Cyclosporin A

J Heart Transplant 1982,1:237-242

**17. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL**

Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors

Science 1999,285:732

**18. Bunzel B, Wollenek G, Grundbock A, Laczkovics A, Teufelsbauer H**

Quality of life and personal satisfaction following heart transplantation: an indicator of treatment results

Herz 1991,16:257-266

**19. Chaudhary PM, Ferguson C, Nguyen V, Nguyen O, Massa HF, Eby M, Jasmin A, Trask BJ, Hood L, Nelson PS**

Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans

Blood 1998,91:4020-4027

**20. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS**

T lymphocyte-endothelial cell interactions.

Annu Rev Immunol 2004,22:683-709

**21. Chuang T, Ulevitch RJ**

Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells.

Biochim Biophys Acta. 2001,1518:157-161

**22. Cotts WG, Johnson MR**

The challenge of rejection and cardiac allograft vasculopathy.

Heart Fail Rev 2001,6:227-240

**23. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW**

The detailed distribution of MHC class II antigens in normal human organs  
Transplantation 1984,38:293-298

**24. Dausset J**

Iso-leuco-anticorps  
Acta Haemat 1958,20:156-166

**25. Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P**

Innate immunity: structure and function of TLRs.  
Med Sci (Paris) 2007,23:67-73

**26. Deng JF, Geng L, Qian YG, Li H, Wang Y, Xie HY, Feng XW, Zheng SS**

The role of toll-like receptors 2 and 4 in acute allograft rejection after liver transplantation.  
Transplant Proc 2007,39:3222-3224

**27. Deuse T, Haddad F, Pham M, Hunt S, Valantine H, Bates MJ, Mallidi HR, Oyer PE, Robbins RC, Reitz BA**

Twenty-Year Survivors of Heart Transplantation at Stanford University.  
Am J Transplant 2008,8:1769-1774

**28. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P**

Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation.  
Kidney Int 2005,67:2454-2461

**29. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, et al.**

Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4.  
Circulation 2002,105:685-690

**30. Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE, Glasebrook AL**

A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile

J Immunol 1989,143:518

**31. Fox-Marsh A, Harrison LC**

Emerging evidence that molecules expressed by mammalian tissue grafts are recognized by the innate immune system.

J Leukoc Biol 2002,71:401-409

**32. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K**

Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart.

Circulation 2000,101:660-667

**33. Furukawa Y, Mandelbrot DA, Libby P, Sharpe AH, Mitchell RN**

Association of B7-1 co-stimulation with the development of graft arterial disease.

Am J Pathol 2000,157:473-484

**34. Furuke K, Nakamura H, Hori T, Iwata S, Maekawa N, Inamoto T, Yamaoka Y, Yodoi J**

Suppression of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin induction by FK506 and cyclosporin A: a new mechanism of immune modulation via redox control

Int Immunol 1995,7:985-993

**35. Gay NJ, Keith FJ**

Drosophila Toll and IL-1 receptor

Nature 1991,351:355-356

**36. Ghebremariam YT, Smith SA, Anderson JB, Kahn D, Kotwal GJ**

Intervention strategies and agents mediating the prevention of xenorejection.

Ann N Y Acad Sci 2005,1056:123-143

**37. Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis FG**

Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection.

J Clin Invest 2003,111:1571-1578

**38. Grady KL, Jalowiec A, White-Williams C**

Predictors of quality of life in patients at one year after heart transplantation

J Heart Lung Transplant 1999,18:202-210

**39. Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE**

Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis.

JAMA 1989,261:3561-3566

**40. Guha M, Mackman N**

The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells.

J Biol Chem 2002,277:32124-32132

**41. Gullestad L, Simonsen S, Ueland T, et al**

Possible role of proinflammatory cytokines in heart allograft coronary artery disease.

Am J Cardiol 1999,84:999-1003

**42. Hadjiliadis D, Davis RD, Palmer SM**

Is transplant operation important in determining posttransplant risk of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients?

Chest 2002,122:1168-1175

**43. Hawlisch H, Kohl J**

Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses.

Mol Immunol 2006,43:13

**44. He H, Stone JR, Perkins DL**

Analysis of robust innate immune response after transplantation in the absence of adaptive immunity.

Transplantation 2002,73:853-861

**45. He H, Stone JR, Perkins DL**

Analysis of differential immune responses induced by innate and adaptive immunity following transplantation.

Immunology 2003,109:185-196

**46. Heine H, Lien E**

Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity.

Int Arch Allergy Immunol 2003,130:180-192

**47. Himmel ME, Hardenberg G, Piccirillo CA, Steiner TS, Levings MK**

The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease.

Immunology 2008,125:145-153

**48. Hodgson JM, Marshall JJ**

Direct vasoconstriction and endothelium-dependent vasodilation. Mechanisms of acetylcholine effects on coronary flow and arterial diameter in patients with nonstenotic coronary arteries.

Circulation 1989,79:1043-1051

**49. Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE, Scherer M, Burns D, Tamburro P, Bromet D, Satran A, Costanzo MR**

Changes in coronary endothelial function predict progression of allograft vasculopathy after heart transplantation.

J Heart Lung Transplant 2004,23:265-271

**50. Holm T, Aukrust P, Andreassen AK, et al**

Peripheral endothelial dysfunction in heart transplant recipients: possible role of proinflammatory cytokines.

Clin Transplant 2000,14:218-225

**51. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL**

An IL-4 transcription factor: Il-4 Stat

Science 1994,265:1701-1706

**52. ISHLT**

International Registry for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth report 2008

[https://www.isHLT.org/downloadables/heart\\_adult.ppt](https://www.isHLT.org/downloadables/heart_adult.ppt), Oktober 2008

**53. Jacobson NG, Szabo SJ, Weber Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE, Murphy KM**

Interleukin 12 signaling in T helper type 1 cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription STAT3 and STAT4

J Exp Med 1995,181:1755

**54. Jamieson SW**

Investigation of heart transplant coronary atherosclerosis

Circulation 1992,85:1211-1213

**55. Janeway CA, Bottomly K**

Signals and signs for lymphocyte responses

Cell 1994,76:275-285

**56. Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL**

Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4.

J Immunol 2002,168:5233-5239

**57. Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL**

Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists.

Crit Rev Immunol 2003,23:15-44

**58. Johnson GB, Brunn GJ, Tang AH, Platt JL**

Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors.

Trends Immunol 2003,24:19-24

**59. Kamogawa Y, Minasi LE, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA**

The relationship of IL-4 and INF- $\gamma$ -producing T cells studied by ablation of IL-4-producing cells

Cell 1993,75:985-995

**60. Kaplan MH, Sun Y-L, Hoey T, Grusby MJ**

Impaired IL-12 responses and enhanced development of TH2 cells in Stat4-deficient mice  
Nature 1996,382:174-177

**61. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MK**

Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of TH2 cells  
Immunity 1996,4:313-319

**62. Keogh AM**

Coronary artery disease in cardiac transplant recipients  
Med J Aust 1995,163:212-214

**63. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al.**

Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis.  
N Engl J Med 2002,347:185-192

**64. Kim KS, Denton MD, Chandraker A, Knoflach A, Milord R, Waaga AM, Turka LA, Russell ME, Peach R, Sayegh MH**

CD28-B7-mediated T cell costimulation in chronic cardiac allograft rejection: differential role of B7-1 in initiation versus progression of graft arteriosclerosis.  
Am J Pathol 2001,158:977-986

**65. Koglin J, Glysing-Jensen T, Gadiraju S, Russel ME**

Attenuated cardiac allograft vasculopathy in mice with targeted deletion of the transcription factor STAT4  
Circulation 2000,101:1034-1039

**66. Kopp EB, Medzhitov R**

The Toll-receptor family and control of innate immunity  
Curr Opin Immunol 1999,11:13-18

**67. Krieger NR, Yin DP, Fathman CG**

CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection

J Exp Med 1996,184:2013-2018

**68. Kübrich M, Petrakopoulou P, Kofler S, Nickel T, Kaczmarek I, Meiser BM, Reichart B, von Scheidt W, Weis M**

Impact of coronary endothelial dysfunction on adverse long-term outcome after heart transplantation.

Transplantation 2008,85:1580-1587

**69. Labarrere CA, Nelson DR, Faulk WP**

Endothelial activation and development of coronary artery disease in transplanted human hearts.

JAMA 1997,278:1169-1175

**70. Laman JD, Schoneveld AH, Moll FL, van Meurs M, Pasterkamp G**

Significance of peptidoglycan, a proinflammatory bacterial antigen in atherosclerotic arteries and its association with vulnerable plaques.

Am J Cardiol 2002,90:119-123

**71. Lee TS, Yen HC, Pan CC, Chau LY**

The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999,19:734-742

**72. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA**

The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults

Cell 1996,86:973-983

**73. Li C, Ha T, Kelley J, Gao X, Qiu Y, Kao RL, Browder W, Williams DL**

Modulating Toll-like receptor mediated signaling by (1->3)-beta-D-glucan rapidly induces cardioprotection.

Cardiovasc Res 2004,61:538-547



**74. Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Beg AA**

An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells.

J Immunol 2001,166:7128-7135

**75. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA**

Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation.

J Exp Med 1991,173:721-730

**76. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA**

CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7.

J Exp Med 1991,174:561-569

**77. Liu G, Wu Y, Gong S, Zhao Y**

Toll-like receptors and graft rejection.

Transpl Immunol 2006,16:25-31

**78. Liu G, Zhao Y**

Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells.

Immunology 2007,122:149-156

**79. Manna PP, Steward N, Lowell J, Mohanakumar T**

Differentiation and functional maturation of human CD14(+) adherent peripheral blood monocytes by xenogeneic endothelial cells: up-regulation of costimulation, cytokine generation, and toll-like receptors.

Transplantation 2002,74:243-252

**80. Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A**

Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo.

Circulation 2001,104:330-335

**81. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA**

A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity

Nature 1997;388:394-397

**82. Medzhitov R, Janeway CA**

Innate Immunity

N Engl J Med 2000;343:338-344

**83. Medzhitov R**

Toll-like receptors and innate immunity.

Nat Rev Immunol 2001;1:135-145

**84. Methe H, Zimmer E, Grimm C, Nabauer M, Koglin J**

Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation.

Transplantation 2004;78:1324-1331

**85. Methe H, Wiegand D, Welsch U, Krombach F, Meiser B, Nabauer M, Koglin J**

Peripheral expansion of circulating T-helper 1 cells predicts coronary endothelial dysfunction after cardiac transplantation.

J Heart Lung Transplant 2005;24:833-840

**86. Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J**

Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome.

Circulation 2005;111:2654-2661

**87. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Arditi M**

Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E.

Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:10679-10684

**88. Modry DL, Oyer PE, Jamieson SW, Stinson EB, Baldwin JC, Reitz BA, Dawkins KD, McGregor CG, Hunt SA, Moran M, et al.**

Cyclosporine in heart and heart-lung transplantation

Can J Surg 1985,28:274-280, 282

**89. Mossman TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffmann RL**

Two types of murine helper T cell clones

J Immunol 1986,136:2348-2357

**90. Mossman TR, Coffmann RL**

TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties

Annu Rev Immunol 1989,7:145-173

**91. Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A**

The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)

J Exp Med 1998,187:2097-2101

**92. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H**

Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex.

J Immunol 2000,164:558-561

**93. Oni AA, Ray J, Hosenpud JD**

Coronary venous intimal thickening in explanted cardiac allografts. Evidence demonstrating that transplant coronary artery disease is a manifestation of a diffuse allograft vasculopathy

Transplantation 1992,53:1247-1251

**94. Palmer SM, Burch LH, Davis RD, et al.**

The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation.

Am J Respir Crit Care Med 2003,168:628-632

**95. Palmer SM, Burch LH, Trindade AJ, Davis RD, Herczyk WF, Reinsmoen NL, Schwartz DA**

Innate immunity influences long-term outcomes after human lung transplant.

Am J Respir Crit Care Med 2005,171:780-785

**96. Paul WE, Seder RA**

Lymphocyte responses and cytokines

Cell 1994,76:241-251

**97. Petrakopoulou P, Kübrich M, Pehlivanli S, Meiser B, Reichart B, von Scheidt W, Weis M**

Cytomegalovirus infection in heart transplant recipients is associated with impaired endothelial function.

Circulation 2004,110(11 Suppl 1):II207-212

**98. Pucci AM, Forbes RD, Billingham ME**

Pathologic features in long-term cardiac allografts

J Heart Transplant 1990,9:339-345

**99. Raisanen-Sokolowski A, Glysing-Jensen T, Mottram PL, Russell ME**

Sustained anti-CD4/CD8 treatment blocks inflammatory activation and intimal thickening in mouse heart allografts.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997,17:2115-2122

**100. Raisanen-Sokolowski A, Glysing-Jensen T, Koglin J, Russell ME**

Reduced transplant arteriosclerosis in murine cardiac allografts placed in interferon-gamma knockout recipients

Am J Path 1998,152:359-365

**101. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF**

A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll

Proc Natl Acad Sci U S A 1998,95:588-593

**102. Röcken M, Saurat JH, Hauser C**

A common precursor for CD4+ T cells producing IL-2 or IL-4

J Immunol 1992,148:1031-1036

**103. Romagnani S**

Induction of TH1 and TH2 responses: a key for the natural immune response?

Immunol Today 1992,13:256-257 + 379-381

**104. Ross R, Glomset JA**

The pathogenesis of atherosclerosis

N Engl J Med 1976,295:369-377 + 420-425

**105. Ross R**

The pathogenesis of atherosclerosis--an update

N Engl J Med 1986,314:488-500

**106. Ross R**

Atherosclerosis--an inflammatory disease

N Engl J Med 1999,340:115-126

**107. Russell ME, Fujita M, Masek MA, Rowan RA, Billingham ME**

Cardiac graft vascular disease. Nonselective involvement of large and small vessels

Transplantation 1993,56:1599-1601

**108. Salomon RN, Hughes CC, Schoen FJ, Payne DD, Pober JS, Libby P**

Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells.

Am J Pathol 1991,138:791-798

**109. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R**

Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses.

Nat Immunol 2001,2:947-950

**110. Schroeder JS, Gao SZ, Hunt SA, Stinson EB**

Accelerated graft coronary artery disease: diagnosis and prevention

J Heart Lung Transplant 1992,11:258-265

**111. Schuster JM, Nelson PS**

Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease.

J Leukoc Biol 2000,67:767-773

**112. Shi C, Lee WS, He Q, et al**

Immunologic basis of transplant-associated arteriosclerosis.

Proc Natl Acad Sci U S A 1996,93:4051-4056

**113. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M**

MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4

J Exp Med 1999,189:1777-1782

**114. Stark RP, McGinn AL, Wilson RF**

Chest pain in cardiac-transplant recipients. Evidence of sensory reinnervation after cardiac transplantation

N Engl J Med 1991,324:1791-1794

**115. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, et al.**

A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions.

A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.

Arterioscler Thromb 1992,12:120-134

**116. Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S**

Essential role of Stat6 in IL-4 signalling

Nature 1996,380:627-630

**117. Takeda K, Akira S**

Toll-like receptors in innate immunity.

Int Immunol 2005,17:1-14

**118. Taylor DO, Edwards LB, Aurora P, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Kucheryavaya AY, Hertz MI**

Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult heart transplant report--2008

J Heart Lung Transplant 2008,27:943-956

**119. Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN**

Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells

Nature 1996,382:171-174

**120. Thoma-Uszynski S, Kiertscher SM, Ochoa MT, Bouis DA, Norgard MV, Miyake K, Godowski PJ, Roth MD, Modlin RL**

Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10

J Immunol 2000,165:3804-3810

**121. Trinchieri G**

Interleukin 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity

Annu Rev Immunol 1995,13:1119-1128

**122. Tsoulfas G, Takahashi Y, Ganster RW, et al.**

Activation of the lipopolysaccharide signaling pathway in hepatic transplantation preservation injury.

Transplantation 2002,74:7-13

**123. Ulevitch RJ, Tobias PS**

Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system

Curr Opin Immunol 1999,11:19

**124. Ulevitch RJ**

Toll gates für pathogen selection

Nature 1999,401:755-756

**125. van Maren WW, Jacobs JF, de Vries IJ, Nierkens S, Adema GJ**

Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress?

Immunology 2008,124:445-452

**126. Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, van Middelaar BJ, Sluijter JP, Smeets MB, Quax PH, Lim SK, Borst C, Pasterkamp G, de Kleijn DP**

In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions.

Circulation 2002,106:1985-1990

**127. Weis M, von Scheidt W**

Cardiac allograft vasculopathy: a review

Circulation 1997,96:2069-2077

**128. Weis M, Pehlivanli S, von Scheidt W**

Heart allograft endothelial cell dysfunction. Cause, course, and consequences.

Z Kardiol 2000,89 Suppl 9:IX/58-62

**129. Weis M, Wildhirt SM, Schulze C, et al**

Coronary vasomotor dysfunction in the cardiac allograft: impact of different immunosuppressive regimens.

J Cardiovasc Pharmacol 2000,36:776-784

**130. Weis M, Pehlivanli S, Meiser BM, von Scheidt W**

Simvastatin treatment is associated with improvement in coronary endothelial function and decreased cytokine activation in patients after heart transplantation.

J Am Coll Cardiol 2001,38:814-818



**131. Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Krobot K, Steinbeck G, Seidel D, Reichart B**

Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience.

Circulation 2003,107:93-97

**132. Wick G**

Atherosclerosis--an autoimmune disease due to an immune reaction against heat-shock protein 60.

Herz 2000,25:87-90

**133. Wick G, Perschinka H, Millonig G**

Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update.

Trends Immunol 2001,22:665-669

**134. Xu Q, Schett G, Perschinka H, Mayr M, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J, Kiechl S, Wick G**

Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population.

Circulation 2000,102:14-20

**135. Yang RB, Mark MR, Gurney AL, Godowski PJ**

Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2

J Immunol 1999,163:639

**136. Young JB**

Cardiac allograft arteriopathy: an ischemic burden of a different sort

Am J Cardiol 1992,70:9F-13F

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Überlebenskurven nach Herztransplantation (52) pTx: post-transplantationem.....  | 7  |
| Abbildung 2: Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Immunantwort.<br>.....   | 8  |
| Abbildung 3: Intrazelluläre TLR4-Signalkaskade (hier NF- $\kappa$ B Signalkaskade) (82)..   | 11 |
| Abbildung 4: Differenzierung der T-Helfer-Lymphozyten.....  | 13 |
| Abbildung 5: Studienschema.....   | 23 |
| Abbildung 6: FACS Dot-Plot hTLR2 Expression auf CD14 <sup>+</sup> Monozyten von Patienten<br>früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zum Kontrollkollektiv.....                                       | 36 |
| Abbildung 7: hTLR2 Expression auf CD14 <sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh und spät<br>nach Herztransplantation im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv (früh<br>gegen Kontrolle: $p < 0,005$ )..... | 37 |
| Abbildung 8: hTLR2 Expression auf CD14 <sup>+</sup> Monozyten bei Patienten früh nach<br>Herztransplantation mit Endotheldysfunktion gegen Patienten ohne<br>Endotheldysfunktion ( $p < 0,05$ ).....              | 38 |
| Abbildung 9: FACS Dot-Plot hTLR4 Expression auf CD14 <sup>+</sup> Monozyten von Patienten<br>früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zum Kontrollkollektiv.....                                       | 39 |
| Abbildung 10: hTLR4 Expression auf CD14 <sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh und spät<br>nach Herztransplantation im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv (früh<br>gegen Kontrolle: $p < 0,05$ )..... | 40 |
| Abbildung 11: hTLR4 Expression auf CD14 <sup>+</sup> Monozyten bei Patienten früh nach<br>Herztransplantation mit Endotheldysfunktion gegen Patienten ohne<br>Endotheldysfunktion ( $p < 0,005$ ).....            | 41 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 12: hTLR4 mRNA Expressionslevel bei Patienten früh nach Herztransplantation mit und ohne endothelialer Dysfunktion ( $p < 0,05$ ) .....  | 42 |
| Abbildung 13: Negative Korrelation von hTLR2 Expression gegen koronare Flussreserve bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation .....  | 43 |
| Abbildung 14: Negative Korrelation von hTLR4 Expression gegen koronare Flussreserve bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation .....  | 43 |
| Abbildung 15: FACS Dot-Plot B7-1 Expression auf CD14 <sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zum Kontrollkollektiv.....                                     | 44 |
| Abbildung 16: B7-1 Expression auf CD14 <sup>+</sup> Monozyten von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv (früh gegen Kontrolle: $p < 0,001$ ) ..... | 45 |
| Abbildung 17: B7-1 Expression auf CD14 <sup>+</sup> Monozyten bei Patienten mit Endotheldysfunktion gegen Patienten ohne Endotheldysfunktion ( $p < 0,05$ ).....   | 46 |
| Abbildung 18: B7-1 mRNA Expressionslevel bei Patienten mit und ohne endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation ( $p < 0,05$ ) .....   | 47 |
| Abbildung 19: Negative Korrelation von B7-1 Expression gegen koronare Flussreserve bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation .....   | 48 |
| Abbildung 20: IL-12 Sekretion von Patienten früh und spät nach Herztransplantation im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv (früh gegen Kontrolle: $p < 0,001$ ) .....                                 | 49 |
| Abbildung 21: IL-12 Sekretion bei Patienten mit und ohne endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation ( $p < 0,02$ ) .....  | 50 |

Abbildung 22: TNF- $\alpha$  Sekretion von Patienten früh und spät nach Herztransplantation  
im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv (früh gegen Kontrolle:  $p < 0,05$ )  
..... 51

Abbildung 23: TNF- $\alpha$  Sekretion bei Patienten mit und ohne endothelialer Dysfunktion  
früh nach Herztransplantation ( $p < 0,05$ ) ..... 52

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anatomische und histologische Unterschiede zwischen  
Transplantatvaskulopathie und klassischer Arteriosklerose ..... 19

Tabelle 2: Klinische und laborchemische Charakteristiken der Studienpopulation (Die  
Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung oder als Anzahl dargestellt.)  
(CFVR = coronary flow reserve (koronare Flussreserve); HLA = humane  
Leukozytenantigene) ..... 34

## **Worte des Dankes**

Diese Promotionsarbeit wurde in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I am Campus Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München, Direktor Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck, verfasst.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Priv.Doz. Dr. med. Jörg Koglin für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas, sowie Herrn Priv.Doz. Dr. med. Heiko Methe für die intensive Betreuung, langjährige tatkräftige Unterstützung, unerschöpfliche Geduld und letztendlich auch Übernahme der Berichterstattung.

Gedankt sei außerdem allen Kollegen und Mitarbeitern der Klinik und des Forschungslabors B für ihre verständnisvolle Unterstützung, im besonderen den medizinisch-technischen Angestellten Frau Cornelia Grimm, Frau Daniela Wiegand und Frau Jong-Oh Kim die mit ihrer konstruktiven Teamarbeit und dem besonders freundschaftlichen Arbeitsklima wesentlich zu der Durchführung und dem Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner lieben Ehefrau Carolin, meinen Eltern Edith und Helmut sowie meinen Schwiegereltern Hildegard und Werner die stets an meiner Seite standen und mich zu jeder Zeit kompromisslos unterstützt und an den Abschluss der Arbeit geglaubt haben.