

Thema:
**„Anti-inflammatorische und
zytoprotektive Gentherapie am Beispiel
der experimentellen Transplantation“**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Medizinische Immunologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität

von

Herrn Dr. rer. nat. Thomas Ritter

geboren am 05.07.1961 in Nürnberg

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. Nat. habil. Josef Brock

2. Prof. Dr. med. Frank Emmrich

Eingereicht im: Februar 2002

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 03.12.2002

Inhaltsverzeichnis:

Vorwort:	3
Einleitung:	3
Transplantation: Stand der Forschung	3
Gentherapie: Einführung	6
Rekombinante Adenoviren:	7
1. Gentherapie in der experimentellen Transplantation mittels adenoviralem Gentransfer	8
1.1. Adenoviraler Gentransfer von Zytokinen moduliert die akute Rejektion allogener Transplantate	8
1.2. Kombinierte Adenovirus- und T-Zelltherapie verbessert die Überlebensrate von allogenen Transplantaten	11
1.3. Adenoviraler Gentransfer von protektiven Molekülen verhindert den Ischämie-/Reperfusionsschaden	13
1.4. Adenoviraler Gentransfer von immunmodulatorischen Molekülen reduziert die Anzeichen einer chronischen Rejektion	16
1.5. Reduktion unerwünschter Immunreaktionen von adenoviralen Vektoren nach <i>in-vivo</i> Applikation	17
2. Generierung regulatorischer T-Zellen mittels retroviralem Gentransfer <i>in-vitro</i>: Ein neuer Ansatz zur Toleranzinduktion bzw. Toleranzerhaltung	19
<i>Charakteristika von regulatorischen T-Zellen</i>	20
<i>In-vitro Generierung von regulatorischen T-Zellen</i>	22
<i>Rekombinante Retroviren:</i>	23
Retroviraler Gentransfer in primäre T-Zellen	23
Zukünftige Entwicklungen der Gentherapie in der Transplantation:	26
Zitierte eigene Arbeiten (in chronologischer Reihenfolge):	29
Zusammenfassungen:	31
Zitierte Abstracts:	31
Zitierte Fremdliteratur:	32
Curriculum Vitae	40

Vorwort:

Ziel der Arbeit war, zu untersuchen, ob der gezielte Einsatz gentherapeutischer Methoden zu einer Verhinderung der Abstoßung allogener Transplantate bzw. zu einer Verhinderung der Induktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens in verschiedenen Transplantationsmodellen der Ratte beitragen kann. Dabei wurden zwei Schwerpunkte gesetzt: Zum einen wurde auf den *ex-vivo* Gentransfer von therapeutischen Molekülen direkt in das Transplantat mit Hilfe von rekombinanten Adenoviren fokussiert. Zum anderen wurde das Potenzial von retroviral modifizierten, allospezifischen T-Zellen als Träger therapeutischer Gene zur Verhinderung der Transplantatrejektion untersucht.

Diese Habilitationsschrift umfasst dreizehn Originalartikel in internationalen Zeitschriften, sechs Übersichtsartikel (Reviews) und vier Manuskripte, die bereits zur Veröffentlichung eingereicht sind.

Einleitung:

Transplantation: Stand der Forschung

Die Transplantation eines allogenen (von einem genetisch nicht-identischen Individuum derselben Spezies) Organs führt in der Regel innerhalb weniger Tage oder Wochen zur Abstoßung im Transplantatempfänger. Die Ursache hierfür ist die Infiltration des allogenen Transplantates mit inflammatorischen Zellen (T-Zellen, Monozyten/Makrophagen) des Transplantatempfängers, die letztendlich zur Zerstörung des Transplantates führen. In den letzten Jahren wurden viele Untersuchungen (sowohl klinisch als auch tierexperimentell) durchgeführt, die sich mit der Unterdrückung von unerwünschten Immunreaktionen nach allogener Transplantation beschäftigten. Auch dank verbesserter Operationstechniken haben sich die einjährigen Überlebensraten auf über 90% verbessert. Dennoch sind die Langzeitüberlebensraten noch immer unbefriedigend. So liegt die Halblebenszeit von Nierentransplantaten zwischen sieben und zehn Jahren bei Leichenspendern (Volk und Reinke, 1999). Trotz der Erfolge der konventionellen Immunsuppression, basierend auf Calcineurin-Inhibitoren (z. B. Cyclosporin A, FK 506), Steroiden, Proliferationshemmern (z. B. Mykophenolatmofetil, MMF), monoklonalen Antikörpern (z. B. anti-Pan T- bzw. anti-Interleukin-2 Rezeptor (IL-2R) Antikörpern) ist das Problem der Transplantatabstoßung – insbesondere das der chronischen Rejektion – noch nicht zufriedenstellend gelöst. Darüber hinaus führt eine lebenslange medikamentöse Immunsuppression fast immer zu gravierenden Nebenwirkungen, wie u.a. zur

Reaktivierung von latenten Virusinfektionen, zur Erhöhung der Inzidenz von Tumoren oder zu nephrotoxischen Effekten. Ziel der modernen Transplantationsforschung ist es, mit einer Kurzzeittherapie die lebenslange Akzeptanz eines fremden Organs ohne langanhaltende Schädigung der generellen Immunantwort zu erreichen. In Tiermodellen gibt es bereits einige Ansätze, die dieser Forderung nahe kommen. Die Basis zum Verständnis dieser Ansätze stellt die genaue Analyse des abgestoßenen oder tolerierten Gewebes dar. Sie zeigt während der akuten Rejektion immer eine massive Infiltration des Gewebes, vor allem mit Monozyten und Lymphozyten. Die Tatsache, dass die Depletion der CD3⁺ Zellen durch monoklonale Antikörper das Transplantat vor Abstoßung schützt, zeigt die kritische Rolle der T-Lymphozyten. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass immundefiziente SCID- bzw. „Nackt“-Mäuse nicht in der Lage sind, ein fremdes Organ abzustößen. Innerhalb der T-Zell-Population scheinen T-Helfer (T_H)-Zellen die Initiatoren der Rejektion zu sein. Dies wurde in CD4- bzw. CD8 T-Zell-depletierten Mäusen gezeigt.

Während die CD8 T-Zell-depletierten Mäuse das Transplantat fast normal abstoßen können, ist dies den CD4 T-Zell-depletierten Tieren in den meisten Modellen nicht möglich (Campos et al., 1995). Geht man vom T_H1/T_H2-Paradigma aus (Mosmann et al., 1989), sind in der frühen Phase der akuten Abstoßung hauptsächlich T_H1-Zellen beteiligt. Es konnte mit Hilfe der semiquantitativen PCR gezeigt werden, dass es bei der Rejektion eines Transplantates zu einem Anstieg charakteristischer T_H1-Zytokine (Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2)) im Transplantat kommt (Siegling et al., 1994a). Wenn man aus diesen Organen die infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen gewinnt und *in-vitro* restimuliert, produzieren diese ebenfalls vorwiegend T_H1-Zytokine. Auf der anderen Seite lassen sich auch T_H2-Zytokine (z. B. Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5)) während der akuten Abstoßung im Transplantat nachweisen (Siegling et al., 1994a), so dass die Rolle von T_H1/T_H2-Zellen in der Transplantation noch nicht entgültig geklärt ist. Insbesondere die Experimente mit genetisch veränderten Mäusen („knock-out“-Mäusen, (-/-)) haben das T_H1/T_H2-Paradigma in der Transplantation ins Wanken gebracht. So stoßen IL-2 -/-, IFN- γ -/-, Perforin -/- aber auch IL-4 -/- Mäuse allogene Transplantate annähernd normal ab. Andererseits können IL-2 -/- und IFN- γ -/- Mäuse nicht mehr durch eine Blockade der Kostimulation toleriert werden. Ein T_H2-Milieu fördert allerdings die Entwicklung von Toleranz.

Zytokine scheinen demnach eine wichtige Rolle bei der Entscheidung, ob ein Transplantat toleriert oder rejeziert wird, zu spielen. Interleukin-10 (IL-10), welches vor allem von

Monozyten/Makrophagen und T-Zellen gebildet wird, hat eine ganze Reihe von anti-inflammatorischen Eigenschaften. So wurde unter anderem gezeigt, dass IL-10 i) die MHC-Klasse II Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen inhibiert, ii) die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , IL-1, IL-8, IL-12 und Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) hemmt und iii) die Proliferation allogene aktivierter Lymphozyten unterdrückt (de Waal Malefyt et al., 1991a; de Waal Malefyt et al., 1991b; Ralph et al., 1992; Cassatella et al., 1993; Qin et al., 1997). IL-10 hat neben den immunsuppressiven Effekten auch stimulatorische Effekte auf T- und B-Zellen. Ein von Epstein-Barr Viren exprimiertes IL-10 Homolog (virales IL-10, vIL-10) besitzt trotz hoher Sequenzhomologie zum zellulären IL-10 nicht mehr dessen immunstimulatorische Eigenschaften und ist somit als wirkungsvolleres Immunsuppressivum anzusehen (Qin et al., 1997).

Als ein zusätzlicher Differenzierungsfaktor für T_H1-Zellen wurde IL-12 beschrieben. Dieses Zytokin wird von Makrophagen und B-Zellen sezerniert, führt zur Erhöhung der IFN- γ Produktion von NK-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen und induziert damit die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu T_H1-Zellen (Hsieh et al., 1993; Germann et al., 1993; Kennedy et al., 1994). IL-12 ist ein heterodimeres Glykoprotein, das aus einer 40kDa (p40) und einer 35kDa (p35) Untereinheit besteht. Die IL-12p40 Untereinheit ist in der Lage, die Effekte des Heterodimers spezifisch zu inhibieren. Nach Mattner et al. (1993) hemmen Überstände von mit murinem IL-12p40 transfizierten COS-Zellen *in-vitro* verschiedene IL-12 Effekte. IL-12p40 inhibiert die Proliferation von PHA und IL-12 aktivierten Splenozyten. Wir konnten zeigen, dass Zellkulturüberstände, die IL-12p40 der Ratte enthalten, die IL-12 induzierte Produktion von IFN- γ in stimulierten Rattenmilzzellen um ca. 50% inhibieren (T. Ritter, eigene unpublizierte Daten).

Neben den bereits beschriebenen Faktoren IL-10 und IL-12p40 scheint Interleukin-4 (IL-4) ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Transplantatrejektion zu spielen. IL-4 wird vor allem von CD4⁺ T-Zellen gebildet und unterstützt die Proliferation von B-Zellen und Mastzellen. Die Bedeutung von IL-4 in der Transplantationsmedizin wird in der Fähigkeit, die Bildung von potenziell schädlichen T_H1-Zellen zu unterdrücken, gesehen, wobei diese Eigenschaft in der Literatur kontrovers diskutiert wird (siehe später, Seite 8).

Neben der akuten Transplantatabstoßung ist, wie bereits erwähnt, das Problem der chronischen Transplantatabstoßung noch weitgehend ungelöst. Die Pathophysiologie der Entstehung einer chronischen Rejektion ist bis jetzt noch weitgehend ungeklärt, es ist jedoch klar, dass sowohl immunologische als auch nicht-immunologische Faktoren involviert sind (Hayry et al., 1993). Als Risikofaktoren für die Entstehung einer

chronischen Rejektion wurden vor allem Unterschiede in den Haupthistokompatibilitäts-Antigenen („HLA-mismatch“), akute Rejektionskrisen, Ischämie-/Reperfusionsschäden, suboptimale Immunsuppression und virale Infektionen identifiziert. Zudem ist bekannt, dass eine Ischämie-/Reperfusionzeit des zu transplantierenden Organs von mehr als 12 Stunden sowohl mit einer primären Non-Funktionalität als auch mit einer schlechten Überlebensprognose des Transplantates in Hinblick auf akute und chronische Rejektion korreliert. Die Mechanismen, die durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden induziert werden, sind komplexer Natur und reichen von verstärkter Expression proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- α), Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen, Infiltration des Transplantates mit inflammatorischen Zellen bis hin zum Absterben der Endothelzellen des Transplantates. Die genaue Ursache, die letztlich zum Ischämie-/Reperfusionsschaden führt, ist nicht vollständig geklärt, oxidative Prozesse scheinen dabei aber eine wichtige Rolle zu spielen (Goode et al., 1994).

Die Verhinderung bzw. Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens sollte somit einen wichtigen Beitrag zur Verhinderung der akuten als auch der chronischen Rejektion leisten.

Gentherapie: Einführung

Der Einsatz gentherapeutischer Methoden hat in der modernen Medizin in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung gewonnen. Unter Gentherapie versteht man ganz allgemein den Transfer von therapeutischen Genkonstrukten in Zellen oder Gewebe zur Behandlung verschiedener Erkrankungen. Die Methoden, die zu einem erfolgreichen Gentransfer eingesetzt werden, reichen vom Einsatz „nackter“ Plasmid-DNA über die Applikation verschiedener Virusfamilien als Genfähre bis hin zu sog. Genkanonen. Im Prinzip lassen sich virale von nicht-viralen Gentransfermethoden unterscheiden, jedoch sind die nicht-viralen Methoden aufgrund ihrer geringen *in-vivo* Effizienz derzeit nicht geeignet.

Viren haben im Laufe der Evolution effiziente Strategien entwickelt, Zellen von Säugetieren zu infizieren und sich in diesen zu vermehren, ohne vom Immunsystem des Wirts erkannt und eliminiert zu werden. Die moderne Molekularbiologie hat sich dies zunutze gemacht und setzt Viren als Transportvehikel für „therapeutische“ Gene zur Behandlung von genetischen Erkrankungen ein. Dabei werden in der Regel viruseigene Gene, sowohl aus Gründen der Aufnahmekapazität für das „therapeutische“ Gen als auch aus Gründen der biologischen Sicherheit, aus dem Virusgenom entfernt. Mehr als vierhundert gentherapeutische Studien wurden bisher bereits weltweit beantragt und

durchgeführt (Rosenberg et al., 2000). Klinische Studien, die die Gentherapie in der Transplantationsmedizin anwenden, wurden bisher jedoch noch nicht durchgeführt. Obwohl die großen Erfolge trotz immenser personeller wie auch finanzieller Anstrengungen bisher ausgeblieben sind, hat die Gentherapie dazu beigetragen, unser Verständnis von bestimmten Erkrankungen zu vertiefen.

Wie bereits erwähnt, haben Viren effiziente Methoden entwickelt, um in tierische Zellen einzudringen und sich dort zu vermehren. Hierfür werden in der Regel bestimmte Oberflächenrezeptoren genutzt, die auf vielen Zellen vorhanden sind. Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene Virusfamilien auf ihre Tauglichkeit als Gentherapievektor untersucht. Vor allem rekombinante Adenoviren haben sich als erfolgversprechende Gentherapievektoren für die Modifikation von Transplantaten erwiesen.

Rekombinante Adenoviren:

Neben den Retroviren (siehe später, Seite 22) wurden in den bisher durchgeführten klinischen Studien vor allem rekombinante Adenoviren eingesetzt. Adenoviren besitzen einer Reihe von Vorteilen, die sie als vielversprechende Vektoren in der Gentherapie auszeichnen. Sie können sowohl teilungsaktive als auch ruhende Zellen mit hoher Effektivität transduzieren und sie lassen sich *in-vitro* in den hohen Konzentrationen anreichern, die für den *in-vivo* Gentransfer benötigt werden. Zudem integrieren Adenoviren nicht in die genomische DNA der Zielzelle (Kay et al., 2001). Rekombinante Adenoviren wurden klinisch bisher vor allem zur Bekämpfung von Tumoren eingesetzt (Serman et al., 1998). Der größte Nachteil in der Applikation von Adenoviren besteht jedoch in der Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort sowohl gegen den Vektor als auch gegen die mit dem Vektor transduzierte Zelle, was letztendlich nur zu einer transienten Genexpression des therapeutischen Moleküls führt (Yang et al., 1995). Zudem ist eine wiederholte Applikation des Gentransfervektors aufgrund der Generierung von neutralisierenden Antikörpern nicht erfolgversprechend. Für eine kurzfristige hohe Expression des therapeutischen Gens scheinen die Adenoviren allerdings geeignet zu sein. Wir haben eine ganze Reihe von adenoviralen Expressionsvektoren (z. B. für immunmodulatorische Zytokine (IL-4, IL-10, IL-12p40) oder für sog. „zytoprotektive“ Gene (z. B. das Anti-Apoptosegen Bag-1 oder das Hitzeschockprotein Hemoxygenase-1, HO-1) hergestellt, die in den verschiedenen Modellen auf ihre Wirksamkeit getestet wurden.

1. Gentherapie in der experimentellen Transplantation mittels adenoviralem Gentransfer

1.1. Adenoviraler Gentransfer von Zytokinen moduliert die akute Rejektion allogener Transplantate

Ad-Gentransfer im Ratten-Transplantationsmodell Experimentelle Strategie

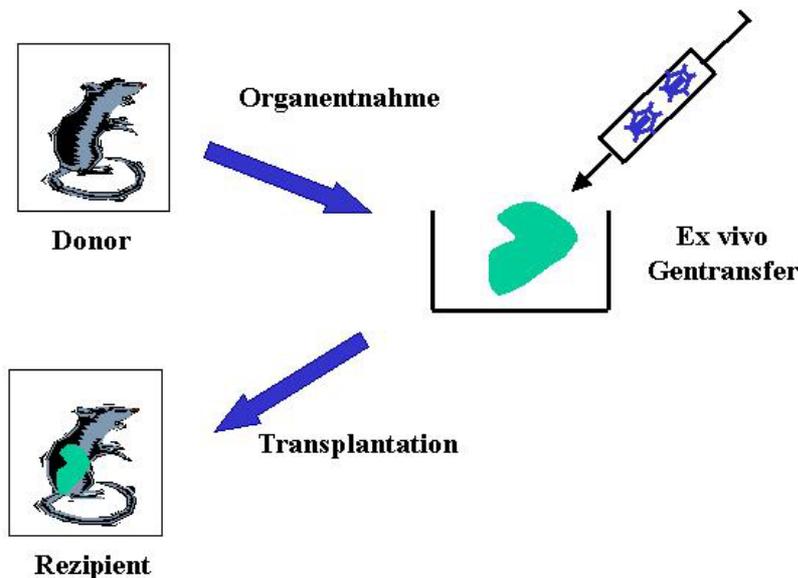


Abbildung 1

Wie bereits erwähnt, wird die Rolle der T_H2 -Zytokine in bezug auf ihr Potenzial zur Prävention der Transplantatrejektion in der Literatur kontrovers diskutiert. So wird berichtet, dass die lokale Überproduktion von IL-4, entweder durch adenoviral transduzierte oder IL-4 transgene Transplantate, nicht zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit führte (Smith et al., 1997; Mueller et al., 1997). Auf der anderen Seite wurde jedoch gezeigt, dass transgene, IL-4 sezernierende Transplantate oder die systemische Applikation von IL-4 - in Kombination mit Cyclosporin A – das Überleben allogener Transplantate verlängern kann (Takeuchi et al., 1997; Rabinovitch et al., 1997). Eine mögliche Ursache hierfür könnte darin liegen, dass unterschiedliche Modelle zur Aufklärung dieser Mechanismen verwendet wurden. Wir haben zunächst das Potenzial eines rekombinanten, IL-4 der Ratte exprimierenden Adenovirus (AdrIL-4) zur Verlängerung des Transplantatüberlebens in einem allogenen Nierentransplantationsmodell der Ratte (LBNF1:RT1^{l+n} auf LEW:RT1^l) untersucht (Abbildung 1). Hierfür wurden in einer einmaligen Behandlung 2×10^9 rekombinante Virus-Partikel (plaque forming units

(pfu) ex-vivo in die Spendernieren perfundiert und für 90 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Organe orthotop transplantiert, wobei zuvor eine Empfänger-eigene Niere entfernt wurde. Am fünften Tag nach der Transplantation wurde die verbliebene zweite Empfänger-eigene Niere entfernt, so dass der Transplantatempfänger allein auf die Funktionsfähigkeit des allogenen Transplantates angewiesen war.

Kontrolltiere, die entweder unbehandelte oder mit einem Reporter-gen-Adenovirus (β -Galaktosidase) behandelte Nieren erhielten, verstarben zwischen Tag 10 und 20 nach der Transplantation (Mittlere Überlebenszeit 13,0 \pm 4,7 Tage bzw. 11,0 \pm 2,4 Tage). Hingegen war das Überleben von Tieren, die AdrIL-4 transduzierte Organe erhielten, signifikant verlängert (Mittlere Überlebenszeit 43,5 \pm 9,5; $p < 0.05$) (Kato et al., 2000; Kato et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Die Serumkreatininwerte, als Indikator für ein funktionell intaktes Transplantat, waren bei den Tieren, die AdrIL-4 transduzierte Nieren erhielten, zum Zeitpunkt der Organentnahme im Vergleich zu Tieren, die mit Kontroll-Vektor transduzierte Nieren erhielten, signifikant erniedrigt ($p < 0.05$). Die molekularbiologische Analyse des Transplantatgewebes mit Hilfe der PCR zeigte, dass das Verhältnis der IL-4/IFN- γ mRNA als Indikator für eine Verschiebung des T_H2/T_H1 -Milieus in Richtung T_H2 in den Langzeitüberlebenden erhöht war (Kato et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Hinweise auf den Mechanismus, der dazu führt, dass allogene Transplantate, die IL-4 überexprimieren, nicht oder nur verzögert abgestoßen werden, wurden vor kurzem beschrieben. Demnach scheint IL-4 immunmodulierend auf antigen-präsentierende Zellen, insbesondere auf dendritische Zellen, zu wirken. Dies führt zu einer Veränderung der Oberflächenexpression bestimmter ko-stimulatorischer Moleküle, die sich hemmend auf die Funktion von zytotoxischen T-Zellen auswirkt (King et al., 2001). Außerdem deutet sich an, dass IL-4 zytoprotektive Gene induziert (Bach et al., 1997).

Als nächstes wurde untersucht, ob sich die erfolgreiche Anwendung des AdrIL-4 Konstruktes im LBNF1/LEW Modell auch auf andere Stammkombinationen bzw. Transplantationsmodelle übertragen lässt. Hierfür wurde zunächst das starke, MHC Klasse I und II inkompatible Nieren-Transplantationsmodell Wistar-Furth auf Lewis (WF:RT1^u auf LEW:RT1^l) gewählt. Es zeigte sich, dass der alleinige adenovirale Gentransfer von IL-4 in diesem stringenten Modell nicht in der Lage ist, die Rejektion eines allogenen Nierentransplantates zu verhindern (Mittlere Überlebenszeit 17 Tage, n=5). Wenn man jedoch noch andere therapeutische Moleküle, wie z. B. Interleukin-10 oder die immunregulativ wirkende Untereinheit von IL-12, p40, zusammen mit IL-4 im Transplantat exprimiert, kommt es zu einer signifikanten Verlängerung der

Transplantataakzeptanz (IL-4/vIL-10, Mittlere Überlebenszeit > 26 Tage, n=4, Tiere wurden an Tag 30 zur Organentnahme getötet und IL-4/IL12p40, Mittlere Überlebenszeit > 24 Tage, n=3, Tiere wurden an Tag 30 zur Organentnahme getötet). Die Serumkreatinin-Untersuchungen zeigen jedoch, dass diese Therapie eine akute Rejektion mit zeitweiliger Funktionseinschränkung nicht verhindern kann. Dennoch kommt es in den gentherapeutisch behandelten Tieren zu einer spontanen Erholung von der akuten Rejektion, während die Kontrolltiere irreversibel rezezierieren. Offensichtlich wird die akute Rejektion nicht verhindert, jedoch stark moduliert (Spontanerholung).

Ähnliche Effekte wie die oben beschriebenen konnten wir auch im Modell der allogenen Korneatransplantation der Ratte (WF:RT1^u auf LEW:RT1^l) beobachten. Während der Gentransfer von IL-4 in die Kornea alleine nicht zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens führt (IL-4, Mittlere Überlebenszeit 12,6 Tage, n=8; unbehandelte allogene Kontrollen, Mittlere Überlebenszeit 14,1 Tage, n=29) (Pleyer et al., 2001 [siehe eigene Vorarbeiten]), bewirkt die kombinierte Applikation von IL-4 und IL-10 einen signifikanten Anstieg des Transplantatüberlebens (Mittlere Überlebenszeit 26,3 Tage, n=10) (Pleyer et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Weitere Untersuchungen, sowohl im Nieren- als auch im Korneatransplantationsmodell, sollen darüber Aufschluss geben, ob der lokale Gentransfer von IL-10 bzw. IL-12p40 im Transplantat alleine in der Lage ist, das Überleben allogener Gewebe signifikant zu verlängern. Für den IL-10 Gentransfer wurde dies mittlerweile in einem Korneatransplantationsmodell des Schafes gezeigt (Klebe et al., 2001).

Nach den erfolgreichen Untersuchungen zur Verhinderung der Transplantatrejektion im Nieren- bzw. Korneatransplantationsmodell mittels adenoviralem Gentransfer von Zytokinen wollten wir nun an weiteren Transplantationsmodellen, z. B. am allogenen Herz- bzw. Inselzelltransplantationsmodell untersuchen, ob sich auch in diesen Modellen die Therapie erfolgreich anwenden lässt. Im allogenen Herztransplantationsmodell in zwei MHC Klasse I und II inkompatiblen Stammkombinationen (Dark Agouti (DA): RT1^{av1} auf LEW: RT1^l und WF: RT1^u auf LEW: RT1^l) führte jedoch der adenovirale Gentransfer – auch bei Ko-Applikation mehrerer therapeutischer Gene – nicht zu einer signifikanten Verlängerung der Transplantataakzeptanz (Ritter et al., 1999, [siehe eigene Arbeiten]; M. Lehmann, Rostock, pers. Mitteilung). Die Ursache für die unterschiedlichen Resultate im Nieren- bzw. Herztransplantationsmodell in bezug auf das Überleben der allogenen Transplantate ist bislang nicht bekannt. Da jedoch – wie oben angedeutet – im Nierentransplantationsmodell gezeigt wurde, dass eine Rejektion nicht verhindert, wohl

aber schnell revertiert wird, könnte das Versagen dieses Ansatzes im Herztransplantationsmodell dadurch erklärt werden, dass Herzen gegenüber einer inflammatorischen Attacke eine kleinere funktionelle Reserve haben und so schneller irreversibel geschädigt werden. Eine andere Erklärung für das unterschiedliche Rejektionsverhalten könnte darin liegen, dass sich Herzmuskelzellen wesentlich besser mit rekombinanten Adenoviren transduzieren lassen als Nierenzellen (T. Ritter, unveröffentlichte Daten). Die daraus resultierende höhere Immunogenität des genetisch modifizierten Transplantates durch die Expression adenoviraler Proteine könnte die Ursache dafür sein, dass in den von uns untersuchten Herztransplantationsmodellen keine Verlängerung der Transplantatakzeptanz zu beobachten war. Es gibt in der Literatur allerdings Hinweise darauf, dass der adenovirale Gentransfer von IL-10 zu einer signifikanten, jedoch moderaten Verlängerung der Transplantatakzeptanz führt (Qin et al., 1997; David et al., 2000). In diesen Arbeiten wurden jedoch nur sog. schwache bzw. wenig-stringente Abstößungsmodelle verwendet.

Die Transplantation von allogenen Inselzellen (aus dem Pankreas isoliert), die *ex-vivo* mit einem IL-10 kodierenden Adenovirus transduziert werden, in diabetische BB-Ratten führte ebenfalls nicht zu einer längerfristigen Normoglykämie (B. Kuttler, Greifswald, pers. Mitteilung). Die Kombination verschiedener therapeutischer Gene wird derzeit in mehreren Inselzell-Transplantationsmodellen auf ihre Wirksamkeit hin untersucht.

1.2. Kombinierte Adenovirus- und T-Zelltherapie verbessert die Überlebensrate von allogenen Transplantaten

Da die Wirksamkeit des Zytokin-Gentransfers mit Hilfe von rekombinanten Adenoviren in den verschiedenen Transplantationsmodellen differierte, stellte sich die Frage, ob eine Kombinationstherapie von adenoviralen mit anderen immunsuppressiven Therapien, z. B. Cyclosporin A, das Überleben allogener Transplantate verlängern kann. Wir konnten wiederum im MHC Klasse I und II inkompatiblen Nieren-Transplantationsmodell Wistar-Furth auf Lewis (WF:RT1^u auf LEW:RT1^l) zeigen, dass die kombinierte Anwendung von AdIL-4 mit suboptimalen Dosen von Cyclosporin A (1,5 mg/kg Körpergewicht/Tag über einen Zeitraum von 10 Tagen) zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit der transplantierten Tiere führte (AdIL-4/Cy A; Mittlere Überlebenszeit 48 Tage, n=3, Tiere zur Organentnahme getötet).

Neben der Anwendung von kommerziell erhältlichen Pharmaka haben wir uns auch mit dem Potenzial von regulatorischen T-Zellen zur Übertragung von Toleranz in Kombination mit dem adenoviralen Gentransfer von Zytokinen beschäftigt. Es ist bekannt, dass eine

kurzzeitige Behandlung von allogenen Transplantatempfängern (Ratte) mit einem nicht-depletierenden monoklonalen Antikörper, der gegen das CD4-Epitop auf T-Helfer Zellen gerichtet ist (anti-CD4, RIB5/2; z.B. 5 Injektionen à 10 mg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 3 Wochen), eine donorspezifische Toleranz bewirken kann (Lehmann et al., 1993). Im Laufe dieser Toleranzinduktion werden offenbar regulatorische Zellen (in der Milz bzw. im Transplantat) gebildet, die in der Lage sind, diese donorspezifische Toleranz auf naive Tiere ohne vorherige Antikörper-Behandlung durch adoptiven Zelltransfer zu übertragen. Aus diesem Grund wurde diese Form der Toleranzinduktion auch als „infektiöse“ Toleranz bezeichnet. Dabei muss jedoch eine relativ hohe Anzahl von Zellen (50×10^6 Milzzellen) übertragen werden. Die Frage, die sich uns nun stellte, war, ob man die dafür nötige Zellzahl bei Anwendung einer weiteren immunmodulierenden Kombinationstherapie (z.B. Zytokin-Gentransfer und regulatorische Zellen) vermindern kann. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Überleben allogener Herztransplantate der Ratte (LBNF1:RT1^{l+n} auf LEW:RT1^l) signifikant verlängerte, wenn die Organe *ex-vivo* mit einem IL-4 exprimierenden Adenovirus transduziert wurden und zusätzlich eine suboptimale Dosis an regulatorischen Zellen appliziert wurde. Hierfür wurde ein Zehntel der optimalen Dosis an tolerierten Milzzellen (5×10^6) mit naiven Milzzellen (45×10^6) gemischt und dem Transplantatempfänger injiziert (50×10^6 Milzzellen, Mittlere Überlebenszeit >100 Tage, n=5; 5×10^6 Milzzellen, Mittlere Überlebenszeit 12,2 Tage, n=4; AdrIL-4 Gentransfer ohne Milzzellen, Mittlere Überlebenszeit 16,8 Tage, n=4; AdrIL-4 Gentransfer kombiniert mit suboptimaler Dosis (5×10^6 Milzzellen), Mittlere Überlebenszeit >60 Tage, n=5) (Ke et al., 2000; [siehe eigene Arbeiten]). Zudem konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden, dass IL-4 und IL-10 im Transplantat erhöht waren, während IL-2 und IFN- γ reduziert waren.

Wie die oben erwähnten Daten zeigen, scheint sich eine Kombinationstherapie aus unterschiedlichen Toleranzinduktionsprotokollen in den tierexperimentellen Transplantationsstudien zu bewähren, die man durchaus als Alternative zu den derzeit in der Klinik verwendeten Immunsuppressiva betrachten könnte. Es soll hier noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der *ex-vivo* Perfusion allogener Transplantate mit rekombinanten Adenoviren um eine einmalige Behandlung handelt. Zudem lassen sich durch die *ex-vivo* Perfusion die adenoviral vermittelten Immunreaktionen im Vergleich zu einer systemischen Applikation von adenoviralen Vektoren in Grenzen halten.

1.3. Adenoviraler Gentransfer von protektiven Molekülen verhindert den Ischämie-/Reperfusionsschaden

Wie bereits beschrieben, kann eine verlängerte Ischämie-/Reperfuionszeit eines Transplantates sowohl zu einer Verminderung der Organqualität als auch zu einer Reduktion der mittleren Überlebenszeit führen. Hinzu kommt, dass aufgrund der negativen Bilanz zwischen Organbedarf und Organspende vermehrt sowohl Transplantate von älteren Spendern als auch Organe schlechter Qualität zur Transplantation herangezogen werden müssen. Es ist jedoch bekannt, dass Organe von älteren Transplantatspendern und Organe minderer Qualität in ihrer Funktion eingeschränkt sind (Amersi et al., 1999; Tullius et al., 2000). Zudem scheinen diese sog. marginalen Organe auch empfindlicher gegenüber einer verlängerten Ischämie-/Reperfuionszeit zu sein. Der Schutz dieser Organe gegen Ischämie-/Reperfuionschäden könnte dazu beitragen, dass mehr Organe ohne kritischen Funktionsverlust transplantiert werden können und könnte somit die Situation der Limitierung von Organspenden entschärfen.

Zerstörerische oxidative Prozesse scheinen eine der Hauptursachen für die Entstehung des Ischämie-/Reperfuionschadens zu sein. Daraus resultieren irreversible Schäden an Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden. Um solchen Prozessen entgegenzuwirken, hat der Organismus anti-oxidative Mechanismen entwickelt, z.B. die Gruppe der Hitzeschock-Proteine. Dazu gehören auch die Hemoxygenasen (HO), die an dem Abbau von Hämoglobin in Biliverdin, Kohlenmonoxid (CO) und freiem Eisen beteiligt sind. Bisher sind drei Isoformen von HO-1 bekannt, wobei die induzierbare HO-1 eine besondere Rolle zu spielen scheint. HO-1 wird nach verschiedensten Stimuli hochreguliert und gilt als empfindlichster Marker für zellulären Stress. HO-1 scheint auch eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Transplantatrejektion zu spielen, denn Herztransplantate von HO-1 defizienten Mäusen werden schnell abgestoßen (Soares et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von Mäusen mit Kobaltporphyrin (CoPP), einem bekannten Induktor von HO-1, zu einer verlängerten Überlebenszeit von Herztransplantaten aus diesen Mäusen führt, wenn sie in allogene Rezipienten transplantiert wurden (Woo et al., 1998). Die Anwendung von Kobaltporphyrin ist jedoch aufgrund seiner schlechten Löslichkeit und seiner in höheren Dosen auftretenden Toxizität problematisch, so dass alternative Modelle zur HO-1 Induktion untersucht wurden. Mit Hilfe eines rekombinanten Adenovirus, der HO-1 (AdHO-1) als therapeutisches Transgen exprimiert (Otterbein et al., 1999), wurde am Beispiel eines Rattentransplantationsmodells für „marginale“ Lebern untersucht, ob die Hochregulation von HO-1 in „marginalen“ Lebern zu einer Verbesserung der Transplantatfunktion und -qualität führt. Das

Lebertransplantationsmodell wurde deshalb ausgewählt, weil sich Leberzellen besonders gut mit rekombinanten Adenoviren transduzieren lassen und erwartet wurde, dass möglichst viele Zellen eines Transplantates das therapeutische Transgen exprimieren sollten. Es konnte zunächst in einem *ex-vivo* Leberperfuisionsmodell gezeigt werden, dass die genterapeutisch behandelten Lebern (AdHO-1) einen deutlich verminderten Ischämie-/Reperfusionsschaden aufwiesen. Dies konnte anhand der gemessenen Parameter (Blutfluss in der Portalvene, Gallenproduktion, Transaminasen) eindrucksvoll belegt werden. Weiterhin konnte in einem isogenen Transplantationsmodell gezeigt werden, dass die AdHO-1 behandelten Lebern eine deutlich verlängerte Transplantatüberlebenszeit aufwiesen (Mittlere Transplantatüberlebenszeit Kontrolle: 14 Tage, n=10-11, bei ca. 40% der Tiere; Mittlere Transplantatüberlebenszeit AdHO-1: 14 Tage, n=10-11, ca. 80% der Tiere) (Amersi et al., 1999), siehe eigene Arbeiten). Ähnliche Ergebnisse brachte die Anwendung von CoPP sowohl im *ex-vivo* Perfuisionsmodell als auch in den isogenen Transplantationsstudien (Amersi et al., 1999), siehe eigene Arbeiten). Mittlerweile liegen auch Untersuchungen in Nieren- bzw. Inselzell-Transplantationsmodellen vor, die zeigen, dass die Induktion von HO-1 zur Verbesserung der Organfunktion und somit auch zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit beiträgt (Tullius et al., 2001; Pileggi et al., 2001). Interessanterweise scheint auch die Überexpression von HO-1 mittels adenoviralem Gentransfer nicht nur im Lebertransplantationsmodell, sondern auch in anderen Modellen, bei denen nicht von einem effizienten Gentransfer ausgegangen werden kann, zu funktionieren (I. Anegon, Nantes, Frankreich, pers. Mitteilung). Dies wiederum wirft die interessante Frage nach dem eigentlichen Mechanismus der HO-1 vermittelten Protektion auf, die derzeit intensiv untersucht wird. Ebenfalls interessant war die Frage, ob die Induktion von HO-1 auch die akute Rejektion im allogenen Transplantationsmodell beeinflussen kann. Erste Daten weisen darauf hin, dass AdHO-1 Gentransfer die Schwere akuter Abstoßungsreaktionen im allogenen Lebertransplantationsmodell deutlich reduziert und zu einem Anstieg von Th2-Zytokinen IL-4 und IL-10 führt (Ke et al., 2001).

Neben den Hitzeschockproteinen scheinen auch andere Genprodukte, die sog. Anti-Apoptosegene, eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Transplantatrejektion zu spielen. Unter Apoptose (programmierter Zelltod) versteht man das kontrollierte Absterben von Zellen im Laufe der Embryonalentwicklung, der Homöostase und der Wundheilung, ohne dass dabei benachbarte Zellen oder Gewebe zerstört werden. Die Induktion von Apoptose scheint auch in bestimmten Krankheits- bzw. Wundheilungsprozessen eine kritische Rolle zu spielen (Thomson 1995; Wilson and Kim, 1998). Die Apoptose wird

durch die Aktivierung eines zelleigenen Selbstmordprogramms ausgelöst, dessen Grundmaschinerie in jeder Zelle vorhanden ist. Der apoptotische Prozess unterteilt sich in mindestens drei Phasen: eine Initiations-, eine Effektor- und eine Degradationsphase (Steller et al., 1995; Kroemer et al., 1997). Während der sehr heterogenen Initiationsphase erhält die Zelle ein „Todessignal“, wie z.B. das Ausbleiben von essentiellen Wachstumsfaktoren, die Ligandation eines signalvermittelnden Rezeptors (z.B. Fas-Rezeptor (APO-1, CD95) oder TNFRI) oder subnekrotisch wirkende Schädigungen (Toxine, Strahlung) (Akbar and Salmon, 1997; Nagata 1997). Die Umsetzung in ein allgemeines Reaktionsmuster erfolgt in der zweiten Phase, die durch die Anwesenheit vieler Proteine (z.B. bcl-2) regulativ beeinflusst wird. Letztendlich kommt es dabei zur Erhöhung der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran und zum Ausstrom eines Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) (Susin et al., 1996; Kroemer et al., 1997). Durch die Freisetzung von AIF kommt es in der letzten Phase zur Aktivierung vieler katabolischer Enzyme, deren Wirken die typischen morphologischen Veränderungen, die für die Apoptose charakteristisch sind, zur Folge hat.

Das anti-apoptotisch wirkende Protein bcl-2 gehört zu einer großen Familie von Proteinen, die entweder Apoptose verhindern (z. B. bcl-2, bcl-xl) oder unterstützen (z. B. Bax, bcl-xs oder Bad) (Cory, 1995). Das Verhältnis zwischen anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Proteinen bestimmt den Ausgang der Entscheidung über den Tod einer Zelle maßgeblich. Neben bcl-2 und bcl-xl konnte noch ein weiteres anti-Apoptosegen identifiziert werden, das sog. bag-1 Gen (Takayama et al, 1995). Es bindet an bcl-2 und verstärkt dessen anti-apoptotisches Potenzial.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Transfektion von bcl-2 in bovine Korneaendothelzellen diese *in-vitro* vor Apoptose schützen kann (Joo et al., 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Applikation eines adenoviralen Vektors, der für das bcl-2 Gen kodiert, in einem syngenem Lebertransplantationsmodell die Induktion eines Ischämie-/Reperfusionsschadens signifikant verhinderte (Bilbao et al., 1999). Untersuchungen zur Applikation von Anti-Apoptosegenen im allogenen Transplantationsmodell wurden bisher noch nicht durchgeführt, könnten aber ein vielversprechender Ansatz in der Prävention der Transplantatabstoßung sein. Wir haben in unseren Untersuchungen das Anti-Apoptosegen eingesetzt, da, wie bereits beschrieben, bag-1 die anti-apoptotische Wirkung von bcl-2 verstärkt. Vor der Applikation von AdBag-1 im allogenen Transplantationsmodell wurde dieses Konstrukt, wie zuvor für HO-1 beschrieben, zunächst sowohl im *ex-vivo* Leberperusionsmodell als auch in der isogenen

Lebertransplantation auf die Fähigkeit, Ischämie-/Reperfusionsschäden zu verhindern, untersucht. Und ähnlich wie bereits für HO-1 beschrieben, konnten wir nach dem Gentransfer von Bag-1 eine signifikante Verbesserung des Portalvenen-Blutflusses, der Gallenproduktion und der Leberfunktion feststellen. Zudem konnte die Transplantatüberlebensrate nach Gentransfer von Bag-1 auf 100% über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen gesteigert werden, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, in der die Applikation eines Reporter-Genkonstruktes (β -Galaktosidase) nur in 50% der Fälle zu einer Transplantatverlängerung führte (Sawitzki et al., zur Veröffentlichung eingereicht, [siehe eigene Arbeiten]).

Es sind weitere Untersuchungen geplant, in denen die kombinierte Applikation von Schutzproteinen (z.B. HO-1 und Bag-1) auf ihre Kapazität, den Ischämie-/Reperfusionsschaden noch weiter zu reduzieren, getestet werden soll. Zudem soll der Gentransfer von Anti-Apoptosegenen auch in allogenen Transplantationsmodellen zum Einsatz kommen.

1.4. Adenoviraler Gentransfer von immunmodulatorischen Molekülen reduziert die Anzeichen einer chronischen Rejektion

Wie bereits beschrieben, konnten wir zeigen, dass der adenovirale Gentransfer von immunregulatorischen Molekülen die akute Rejektion in einem allogenen Nierentransplantationsmodell signifikant verhindern kann. Neben der Problematik der akuten Rejektion spielt heute vor allem die Beherrschung der chronischen Transplantatabstoßung eine wichtige Rolle in der Klinik. Die chronische Rejektion ist gekennzeichnet durch einen schleichenden Funktionsverlust des Transplantates über einen längeren Zeitraum hinweg, der - am Beispiel der Niere - zu einem Verlust von Nephronen und einer zunehmenden Fibrosierung führt. Im Gegensatz zur akuten Transplantatabstoßung ist derzeit keine medikamentöse Behandlung der chronischen Transplantatabstoßung möglich. Als Ursachen der chronischen Rejektion werden sowohl immunologische als auch nicht-immunologische Mechanismen diskutiert (Hayry et al., 1993). Es ist bekannt, dass bei den immunologischen Mechanismen der chronischen Transplantatabstoßung proinflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle spielen. Wir haben uns daher die Frage gestellt, ob die frühe Expression immunmodulatorischer Proteine – wie für die akuten Abstoßungsmodelle beschrieben – einen Einfluss auf die Entstehung einer chronischen Rejektion haben kann und deren Schwere reduzieren oder sie sogar ganz verhindern kann. Um diese Frage zu beantworten, haben wir im Modell der chronischen Rattennieren-Transplantatabstoßung den Gentransfer mehrerer

immunmodulatorischer Proteine (IL-10, IL-12p40 und TNFRp55-Ig) untersucht. Da nicht bekannt war, welche Auswirkungen der Gentransfer eines einzelnen therapeutischen Genkonstrukts auf die chronische Rejektion ausüben wird, haben wir – wie bereits beschrieben – die kombinierte Applikation von mehreren Konstrukten gleichzeitig durchgeführt.

Als Modell haben wir wiederum das allogene Nierentransplantationsmodell der Ratte gewählt. Bei den Untersuchungen zur chronischen Transplantatabstoßung verwendet man in der Regel ein sog. schwaches Abstoßungsmodell (Fisher F344:RT1^{lv1} auf Lewis RT1^l), in dem in den ersten 10 Tagen nach der Transplantation eine suboptimale Dosis an Cyclosporin A (1,5mg/kg Körpergewicht) appliziert wird. Dieses Behandlungsschema führt innerhalb von 6 Monaten zu einer chronischen Rejektion (Tullius et al., 2000).

Wir konnten zeigen, dass die Blockade von TNF- α (vermittelt vor allem durch das lösliche TNF-Rezeptor Konstrukt und durch den IL-10 Gentransfer) als auch von IL-12 (vor allem durch den Gentransfer der inhibitorischen p40 Untereinheit von IL-12 und durch den IL-10 Gentransfer) die Funktionsfähigkeit allogener Nierentransplantate signifikant verbessert. Dies konnte anhand mehrerer untersuchter Parameter (Proteine im Urin, Creatinin-Clearance, morphologische und immunhistologische Befunde) gezeigt werden (Yang et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Besonders auffällig war die an Gewebeschnitten beobachtete signifikante Reduktion der transplantatinfiltrierenden Monozyten/Makrophagen im Vergleich zu Kontrollen. Im Gegensatz zur Überexpression von IL-10, IL-12p40 und TNFRp55-Ig führt die Überexpression von IFN- γ direkt nach der Transplantation zu einer deutlich beschleunigten Verschlechterung der Transplantatfunktion, was letztlich zum Tod der Versuchstiere führte (Yang et al., zur Veröffentlichung eingereicht).

Wir konnten somit zeigen, dass die Modulation einer Immunreaktion durch die lokale Überexpression von therapeutischen Molekülen zu einem frühen Zeitpunkt nach der Transplantation das Risiko der Entstehung einer chronischen Rejektion beeinflussen kann.

1.5. Reduktion unerwünschter Immunreaktionen von adenoviralen Vektoren nach *in-vivo* Applikation

Wie bereits beschrieben, sind rekombinante Adenoviren in besonderer Weise dafür geeignet, therapeutische Moleküle in Organe zu transferieren, da sie sowohl ruhende, ausdifferenzierte als auch proliferierende Zellen mit hoher Effektivität transduzieren können (Kay et al., 2001). Ein Nachteil beim adenoviralen Gentransfer besteht allerdings in der Induktion sowohl einer humoralen als auch einer zellulären Immunantwort. Dies

führt letztlich zu einer nur transienten Expression des therapeutischen Gens, da die adenoviral transduzierten Zellen vom Immunsystem des Transplantatempfängers aufgrund der Präsentation adenoviraler Peptide via MHC-Klasse I an der Zelloberfläche erkannt und eliminiert werden (Yang et al., 1995). Hinzu kommt, dass die Applikation von rekombinanten Adenoviren zu einer akuten Immunreaktion führt, die sowohl die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine als auch die Rekrutierung proinflammatorischer Zellen (Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen) beinhaltet (Brenner et al., 1999), was sich – wie oben bereits beschrieben – negativ auf die Organfunktion eines Transplantates auswirkt. Neben den transplantatschädigenden Einflüssen kann die Rekrutierung proinflammatorischer Zellen und deren Zytokine auch direkt auf den Gentransfer bzw. auf die eingesetzten Vektoren einwirken. Es wurde gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine einen negativen Einfluss auf die Expression des therapeutischen Gens haben, wenn diese – wie in den meisten Fällen – über virale Regulationselemente (z. B. CMV-Promoter, SV40-Promoter) gesteuert werden (Qin et al., 1997; Bromberg et al., 1998, Ritter et al., 1999, [siehe eigene Arbeiten]). Insgesamt sind die oben beschriebenen immunologischen Reaktionen nach dem adenoviralen Gentransfer als schädlich für die Transplantatfunktion einzustufen. Es war daher wichtig, zu untersuchen, wie sich diese unerwünschten Immunreaktionen verhindern lassen.

Zunächst wurde untersucht, ob die Applikation von monoklonalen Antikörpern, die in der Lage sind, immunmodulierend zu wirken und Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten zu induzieren, die Infiltration von inflammatorischen Zellen in das Transplantat verhindern kann und zu einer Verlängerung der Transgen-Expression führt. Für diese Studien wurde ein syngenes Herztransplantationsmodell (LEW:RT1^l auf LEW:RT1^l) gewählt. Nach der Organentnahme wurde das Organ *ex-vivo* mit einem adenoviralen Reporterkonstrukt (β -Galaktosidase) perfundiert und danach unter Toleranz-induzierender anti-CD4-Therapie transplantiert. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sich die Expression des Transgens unter anti-CD4 Therapie signifikant verlängert (Schröder et al., 2000; [siehe eigene Arbeiten]). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der adenovirale Gentransfer in das Herztransplantat in den nicht-behandelten Kontrollen sowohl zu einer massiven Infiltration inflammatorischer Zellen als auch zur Produktion proinflammatorischer Zytokine führt, was wahrscheinlich die Ursache für den frühzeitigen Verlust des Transgens ist. Im Gegensatz dazu ist unter anti-CD4 Therapie die Infiltration dieser Zellen deutlich vermindert. Zudem ist sowohl die Produktion von T_H1-Zytokinen (vor allem IFN- γ) von transplantatinfiltrierenden Zellen als auch die humorale

Immunantwort gegen adenovirale Partikel deutlich reduziert (Schröder et al., 2000; [siehe eigene Vorarbeiten]). Interessanterweise führt die anti-CD4 Therapie jedoch nicht zu einer signifikanten Reduktion der Produktion von TNF- α . Da jedoch, wie bereits erwähnt, TNF- α eine wichtige Rolle bei der Induktion eines Ischämie-/Reperfusionsschadens nach der Entnahme eines Transplantates spielt, war es wichtig, zu untersuchen, ob mit gentherapeutischen Methoden eine lokale Hemmung der TNF- α Produktion erreicht werden kann. Wir konnten zeigen, dass syngene Herztransplantate eine signifikante Reduktion der Infiltration von proinflammatorischen Zellen (T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen) aufwiesen, wenn ein adenovirales Konstrukt, welches für einen löslichen chimären TNF-Rezeptor, bestehend aus dem extrazellulären Teil des humanen TNFRp55-Rezeptors und der konstanten Region des murinen IgG1-Moleküls, kodiert, appliziert wird. Diese deutliche Reduktion von infiltrierenden Zellen führte auch dazu, dass auf transkriptioneller Ebene (mRNA) die Produktion von TNF- α gehemmt wurde (Ritter et al., 2000; [siehe eigene Arbeiten]). Die Applikation des löslichen chimären TNF-Rezeptors scheint somit ein geeignetes Werkzeug zu sein, sowohl die Induktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens als auch Immunreaktionen gegen adenoviral transduzierte Zellen zu reduzieren.

Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob die Blockade von TNF- α auch in den allogenen Transplantationsmodellen effektiv angewendet werden kann.

2. Generierung regulatorischer T-Zellen mittels retroviralem Gentransfer *in-vitro*: Ein neuer Ansatz zur Toleranzinduktion bzw. Toleranzerhaltung.

In den letzten Jahren rückte die Funktion regulatorischer Zellen in verschiedenen Toleranzmodellen zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses. Das Phänomen der übertragbaren Toleranz wurde ursprünglich als Suppression bezeichnet und erstmals von Gershon (1975) beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Toleranz in Tieren, die mit Schaf-Erythrozyten immunisiert wurden, durch den Transfer von T-Zellen auf naive Mäuse übertragen werden konnte. Mit einer Reihe von Protokollen ist es mittlerweile möglich, im adoptiven Transfermodell suppressiv wirkende T-Zellen zu induzieren, z. B. durch donorspezifische Bluttransfusion (DST) (Mottram et al., 1990), Knochenmarkstransplantation (Bemelman et al., 1998), anti-CD4 bzw. anti-CD4/CD8 monoklonale Antikörper (Cobbold and Waldmann, 1998) und Blockierung der Rezeptoren

für die Ko-Stimulation durch CTLA4-Ig (Khoury et al., 1999) bzw. anti-ICAM-1 (Isobe et al., 1997) und anti-CD40L mAk (Khoury et al., 1999).

Sehr gut untersucht ist das System der Toleranzinduktion in Nagern durch die Behandlung der Transplantatempfänger mit einem anti-CD4 mAk. Diese sind gegen den CD4-Rezeptor gerichtet und modifizieren das über den T-Zell Rezeptor vermittelte Signal 1 (Chen et al., 1992; Lehmann et al., 1992; Pearson et al., 1993; Siegling et al., 1994b). Die kurzzeitige Behandlung (< 3 Wochen) der Transplantatempfänger führt in vielen Modellen zur Entwicklung einer stabilen Toleranz (Lehmann et al., 1997; Cobbold and Waldmann, 1998 u.a.). In einigen Modellen ist eine Toleranzinduktion sogar durch einmalige Vorbehandlung der Empfängertiere mit Donorantigen + anti-CD4 mAk möglich.

Regulatorische CD4⁺ T-Zellen scheinen in diesen Modellen eine wesentliche Rolle für den Erhalt und möglicherweise auch für die Induktion von Toleranz zu spielen. Die Arbeitsgruppe um H. Waldmann konnte erstmals zeigen, dass adoptiv transferierte regulatorische T-Zellen nicht nur die Toleranz übertragen, sondern im Rezipienten auch naive alloreaktive T-Zellen zu regulatorischen Zellen umprogrammieren. Dieses Phänomen wurde von H. Waldmann 1993 erstmals als „infektiöse Toleranz“ bezeichnet (Qin et al., 1993). Allerdings waren diese Experimente nur in einem schwachen „Abstoßungsmodell“ erfolgreich. Mit Hilfe eines nicht-depletierenden anti-CD4 mAk (RIB 5/2, Lehmann et al., 1992) gelang es, dieses Phänomen auch in einem starken „Abstoßungsmodell“ der Ratte zu zeigen (Onodera et al., 1996).

Charakteristika von regulatorischen T-Zellen

Die Frequenz dieser regulatorischen T-Zellen in peripheren Lymphorganen von anti-CD4 behandelten allotransplantierten Tieren ist sehr niedrig. Mindestens 50×10^6 Milzzellen müssen in ein naives Tier transferiert werden, um donorspezifische Toleranz zu übertragen (Onodera et al., 1996; Davies et al., 1996). Aus den Arbeiten der Waldmann-Gruppe und eigenen Beobachtungen zeigte sich, dass die toleranzübertragenden Eigenschaften derartiger Milzzellen sich frühestens 4-6 Wochen nach einer Transplantation unter anti-CD4 mAk-Therapie nachweisen lassen. Dies wurde als die notwendige Zeit für die funktionelle Differenzierung derartiger Zellen interpretiert. Interessanterweise lässt sich Toleranz jedoch schon viel früher (nach 14 Tagen) und mit viel weniger Zellen ($1-2 \times 10^6$) mittels transplantatinfiltrierender Zellen übertragen (B. Sawitzki, pers. Mitteilung). Für die Induktion der CD4⁺ T-Zell vermittelten „infektiösen“ Toleranz scheint der Thymus (zentrale Toleranz) eine wichtige Rolle zu spielen, obwohl in den meisten Modellen zur Toleranzinduktion mittels Antikörpern die periphere Toleranzinduktion als bedeutender

angesehen wird. Unsere Untersuchungen hierzu wurden im MHC-inkompatiblen, heterotopen Herztransplantationsmodell der Ratte durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass donorspezifische Toleranz nur in 50% der Transplantatempfänger unter anti-CD4 mAk-Therapie erreicht werden konnte, bei denen zuvor der Thymus entfernt wurde. Für den Erhalt der Toleranz bzw. der toleranzinduzierenden Zellen scheint der Thymus jedoch nicht essentiell zu sein (Onodera et al., 1998 [siehe eigene Vorarbeiten]). Die Bedeutung der regulatorischen Zellen zeigt sich in diesen Experimenten auch darin, dass in den thymektomierten Langzeitüberlebenden (50 %), nicht jedoch in euthymischen Tieren die Toleranz durch IL-2 leicht gebrochen werden kann.

Wie die „infektiöse“ Toleranz vermittelt wird, ist im Wesentlichen noch unklar. Regulatorische Zytokine scheinen dabei aber eine wichtige Rolle zu spielen. So wurde gezeigt, dass die Applikation eines neutralisierenden Antikörpers gegen IL-4 die Toleranzinduktion durch T-Zelltransfer zumindest partiell inhibierte (Davies et al., 1996). Außerdem konnten, mit Hilfe der semi-quantitativen PCR, stark erhöhte IL-4/IL-10 mRNA-Spiegel in den transplantierten Organen (auch nach mehreren Übertragungen) nachgewiesen werden (Onodera et al., 1997). Wir haben beobachtet, dass der alleinige adenovirale Gentransfer von IL-4 in allogene Herztransplantate zwar keine Effekte zeigte, jedoch synergistisch mit suboptimalen Dosen regulatorischer T-Zellen aus toleranten Tieren wirkte. Dies könnte darauf hinweisen, dass IL-4 entweder transplantatzerstörende T-Zellen zumindest partiell hemmt, so dass eine kleinere Anzahl regulatorischer Zellen für die Transplantaterhaltung ausreichend ist, und/oder dass regulatorische Zellen durch ein IL-4 Milieu expandieren und funktionell aktiviert werden (Ke et al, 2000 [siehe eigene Vorarbeiten]).

Regulatorische T-Zellen aus dem Thymus scheinen auch an der Prävention von Autoimmunerkrankungen beteiligt zu sein. So konnte gezeigt werden, dass der adoptive Transfer von peripheren CD4⁺ T-Zellen bzw. CD4⁺ Thymozyten in syngene, thymektomierte Tiere die Ausbildung von Autoimmunität verhinderte. In Autoimmunmodellen der Ratte konnte der Phänotyp dieser Zellen näher charakterisiert werden. Bei diesen regulatorischen T-Zellen der Ratte handelt es sich um CD45RC^{low} T-Zellen, die IL-2 und IL-4, aber kein IFN- γ produzieren (Fowell und Mason, 1993; Zhai et al., 2001). In Mausmodellen scheint diese Zellpopulation dem CD45RB^{low}-Phänotyp zu entsprechen. Es konnte gezeigt werden, dass der Transfer von CD45RB^{high}-Zellen in immundefiziente SCID-Mäuse Kolitis induzieren kann, welche nach kombinierter Applikation von CD45RB^{low}-Zellen verhindert wurde. Diese CD45RB^{low}-Zellen

produzieren große Mengen an Interleukin-10 (IL-10) nach *in-vitro* Restimulation (Groux and Powrie, 1999) und die Neutralisierung von IL-10 durch monoklonale Antikörper verhindert den therapeutischen Effekt der adoptiv transferierten CD45RB^{low} T-Zellen. Eine ähnliche Zellpopulation mit immunregulatorischen Eigenschaften wurde vor kurzem auch für die Induktion von Toleranz im Maustransplantationsmodell nach DST+anti-CD4 mAk-Therapie charakterisiert (Hara et al., 2001). Auch hier konnte der Effekt durch anti-IL-10 mAk aufgehoben werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-10 *in-vitro* regulatorische Zellen generieren kann (Groux et al., 1997).

In-vitro Generierung von regulatorischen T-Zellen

Die oben aufgeführten Argumente weisen auf die Bedeutung der regulatorischen T-Zellen bei der Induktion von Toleranz hin. Bisher wurden diese Zellen allerdings nur *in-vivo* generiert. Eine *in-vitro* Generierung dieser T-Zellen wäre daher von großer Bedeutung. Diese gestaltet sich aber - abgesehen von einigen Berichten über IL-10 generierte regulatorische T-Zellen - sehr schwierig. Es ist bisher auch nicht gelungen, *in-vivo* generierte regulatorische Zellen längere Zeit in Kultur zu halten oder gar zu vermehren (JW Kupiec-Weglinski, pers. Mitteilung und eigene Beobachtungen). Offensichtlich kennen wir die Wachstums- und Überlebensfaktoren regulatorischer Zellen noch nicht gut genug. Auch zeigen die Daten der letzten Jahre, dass regulatorische Zellen durchaus keine homogene Population darstellen und dass unterschiedliche Subpopulationen andere Eigenschaften besitzen.

Es scheint uns daher ein sinnvoller Ansatz zu sein, regulatorische Zellen durch gezielte Überexpression von regulatorischen Molekülen *in-vitro* zu generieren und *in-vivo* einzusetzen.

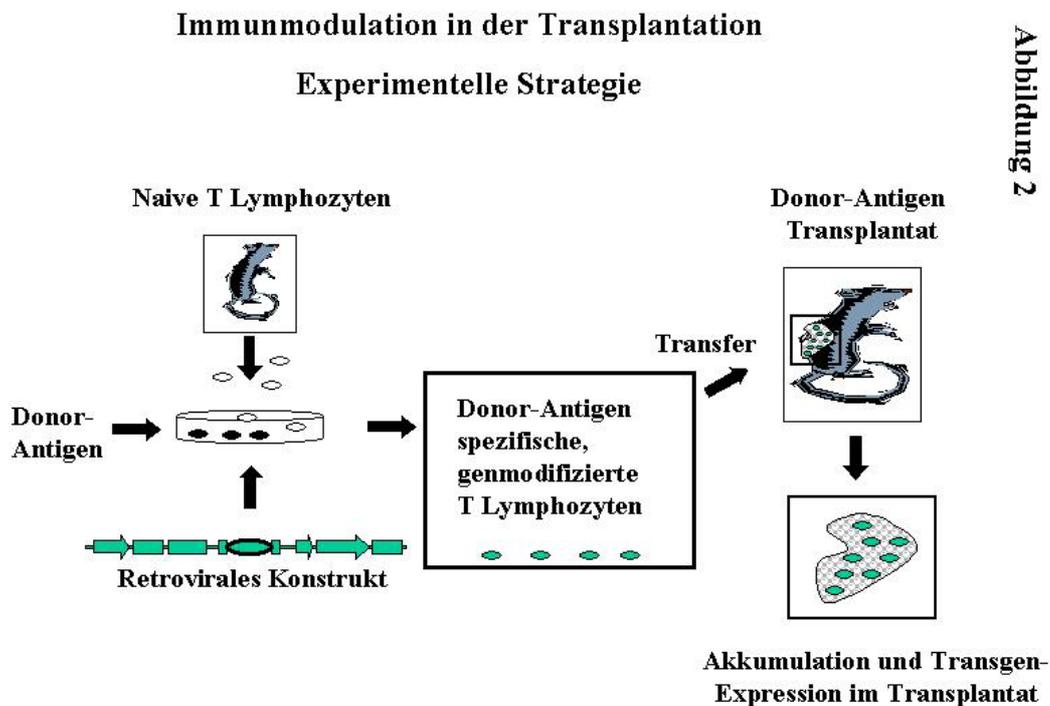
Das Problem vieler Arbeiten zum Gentransfer ist immer noch die optimale Applikation des therapeutischen Moleküls. Die systemische Gabe eines Zytokins kann niemals ein lokales Milieu schaffen, welches der physiologischen Situation entspricht. Außerdem haben Zytokine im Serum nur eine sehr kurze Halbwertszeit, so dass das therapeutische Protein ständig nachgeliefert werden müsste, um den gewünschten Serumspiegel zu erreichen. Die systemische Gabe von Zytokinen kann zudem zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Durch die Transduktion des Spenderorgans mit rekombinanten Adenoviren, die immunregulatorische Zytokine exprimieren, kann die Zytokinexpression im Transplantat gesteigert werden, sie ist aber aufgrund der hohen Immunogenität der Adenoviren nur transient (ca. 3-4 Wochen) und keinesfalls aktivierungsabhängig. Für eine längerfristige,

wie auch für eine aktivierungsabhängige verstärkte Expression des therapeutischen Gens sind vor allem rekombinante Retroviren geeignet.

Rekombinante Retroviren:

In den meisten der bisher durchgeführten klinischen Studien wurden Retroviren als Gentransfervektor eingesetzt (Rosenberg et al., 2000). Rekombinante Retroviren basieren in der Regel auf dem „Grundgerüst“ des murinen Moloney Leukämie Virus (MoMuLV), dem wie bei rekombinanten Adenoviren essentielle Gene für die Virusreplikation und Vermehrung entfernt wurden. Sie sind in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen zu transduzieren und stabil in die DNA der Wirtszelle zu integrieren, so dass das therapeutische Gen an die Tochterzellen weitergegeben werden kann (Kay et al., 2001). Nachteile des retroviralen Gentransfers sind darin zu sehen, dass nur teilungsaktive Zellen transduziert werden können, da die Auflösung der Membran des Zellkerns im Verlauf der Mitose die Voraussetzung dafür ist, dass das Retrovirus in die zelluläre DNA integrieren kann. Zudem kann die Integration der fremden DNA in Bereichen, die die Proliferationsaktivität der Zellen steuern, zu unkontrolliertem Wachstum der transduzierten Zellen führen.

Retroviraler Gentransfer in primäre T-Zellen



Retroviral transfizierte T-Zellen sind in der Lage, stabil und dauerhaft ein Protein zu exprimieren (Blaese et al., 1995). Besonders aktivierte T-Zellen exprimieren vermehrt ihr

Transgen (Quinn et al., 1998). Bisher wurden retroviral transduzierte T-Zellen hauptsächlich zur Tumorbekämpfung eingesetzt. Hierbei wurden *ex-vivo* generierte, tumorspezifische T-Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen (wie beispielsweise TNF- α) transduziert, die bei späterer Infiltration den Tumor und seine Metastasen „bekämpfen“. Wir konnten kürzlich zeigen, dass retroviral transduzierte allospezifische T-Zellen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* mit einer verstärkten Transgen-Expression reagieren, wenn sie mit dem spezifischen Antigen stimuliert werden (Hammer et al., 2000 [siehe eigene Arbeiten]). Dies könnte die Basis für einen neuartigen Therapieansatz in der Transplantation darstellen (Abbildung 2). Für diese Arbeiten haben wir das von Flügel et al. (1999) beschriebene retrovirale Gentransfersystem in primäre T-Zellen übernommen und für unsere Anforderungen modifiziert. Die alloreaktiven, transgenen T-Zellen werden in einem Ko-Kultursystem generiert. Dies setzt sich zum einen aus der Virus-produzierenden Verpackungszelllinie und zum anderen aus einer gemischten Lymphozytenkultur, die aus bestrahlten Stimulatorzellen (um diese an der unerwünschten Proliferation zu hemmen) und Responderzellen des Transplantatempfängers zusammen.

Alle Zellen, die im Zuge des retroviralen Gentransfers nicht transduziert wurden, gehen im Rahmen einer Antibiotika-Selektion zugrunde, so dass nur die Zellen überleben, die durch das Retrovirus transduziert wurden. Die so generierten proliferierenden Zellen können durch weitere Restimulationsschritte vermehrt werden, um eine ausreichend große Anzahl von Zellen für die Applikation in den Transplantationsmodellen zur Verfügung zu haben.

Wir konnten in diesem System erstmals zeigen, dass *in-vitro* generierte allospezifische T-Zellen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* bei Antigen-Kontakt verstärkt das Transgen (in unserer Arbeit das Reportergen EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein), welches in die T-Zellen mit Hilfe eines Retrovirus eingebracht wurde, exprimieren (Hammer et al., 2000 [siehe eigene Arbeiten]). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für Untersuchungen, in denen immunregulatorische Proteine (z.B. IL-4 oder IL-10) nach retroviralem Gentransfer zur Verhinderung der Transplantatrejektion exprimiert werden sollen. Außerdem weisen diese retroviral transduzierten T-Zellen den gleichen Phänotyp (CD4⁺, CD25⁺, CD45RC^{low}) wie die oben beschriebenen Toleranz-induzierenden T-Zellen auf (Hammer et al., 2002 [siehe eigene Arbeiten]). Noch wichtiger aber war, dass wir zeigen konnten, dass die allospezifischen T-Zellen nach intravenöser Applikation auch tatsächlich zu den entscheidenden Orten der Antigenpräsentation/-auseinandersetzung (Lymphknoten, Milz) hinwandern. Dies wurde mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie an Gewebeschnitten bestätigt. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die allospezifischen T-

Zellen nicht nur in den Lymphknoten und in der Milz, sondern tatsächlich auch im Allotransplantat verstärkt zu finden sind, jedoch kaum in Kontroll- oder Allotransplantaten mit anderen MHC-Antigenen („third-party“ Transplantaten) (Hammer et al., 2002 [siehe eigene Arbeiten]).

Diese Untersuchungen erfolgten sowohl durch histologische Auswertung von Gewebeschnitten als auch mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS), wobei die T-Zellinfiltrate aus dem Transplantat isoliert und die EGFP-transduzierten T-Zellen am FACS analysiert wurden. Dabei konnten wir zeigen, dass die T_{EGFP}-Lymphozyten aus dem Allotransplantat neben dem Transgen selbst auch den Aktivierungsmarker CD25 (α -Kette des IL-2 Rezeptors) verstärkt exprimieren. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn sie aus einem syngenen Transplantat oder einem Allotransplantat mit anderen MHC-Antigenen („third-party“ Transplantaten) isoliert wurden (Hammer et al., 2002 [siehe eigene Arbeiten]).

Die oben beschriebenen Vorarbeiten in Bezug auf die Akkumulation und Transgen-Expression *ex-vivo* generierter allospezifischer T-Zellen waren die Voraussetzung für die Experimente mit allospezifischen T-Zellen, die immunmodulierende Transgene sezernieren. Hierfür wurden zunächst allospezifische T-Zellen generiert, die als therapeutisches Gen vIL-10 exprimieren. Zunächst wurden diese Zellen *in-vitro* auf ihr immunmodulierendes Potenzial untersucht. Wir konnten in unseren Experimenten zeigen, dass die Zugabe dieser Zellen (5% der naiven Zellen) zu naiven, Antigen-stimulierten T-Zellen diese sowohl in ihrer Proliferationskapazität als auch in ihrer Fähigkeit, IFN- γ zu produzieren, deutlich hemmt (Ritter et al., 2001; Abstract ASGT). Damit sind die Voraussetzungen für eine *in-vivo* Applikation der T_{vIL-10}-Lymphozyten gegeben. Die entsprechenden Untersuchungen werden derzeit im allogenen Herztransplantationsmodell der Ratte durchgeführt.

Zukünftige Entwicklungen der Gentherapie in der Transplantation:

Für eine breite Anwendung am Menschen sind die oben beschriebenen Applikationen von Gentherapie-Vektoren bzw. genterapeutisch veränderten T-Zellen sicherlich noch nicht geeignet. Zumal es nach dem tragischen Todesfall von Herrn Jesse Gelsinger, der an einer Gentherapiestudie mit Hilfe von rekombinanten Adenoviren zur Behandlung eines partiellen Ornithin-Transcarbamylasedefizienz teilnahm (Knorr, 1999), außerordentlich wichtig ist, die molekularen Grundlagen der Interaktion zwischen Viren und Wirtsorganismus noch besser zu verstehen und verbesserte Vektoren und Therapien zu entwickeln. Es ist uns jedoch gelungen, zu zeigen, dass eine genterapeutische Intervention zur Verhinderung der Transplantatrejektion bzw. zur Verhinderung des Ischämie-/Reperfusionsschadens durchaus sinnvoll sein kann.

Es gibt eine ganze Reihe von interessanten Ansätzen, verbesserte Gentherapievektoren zu entwickeln. Hauptaugenmerk liegt dabei in der Generierung von niedrig-immunogenen Viren, vor allem bei Adenoviren. Hier macht man es sich zunutze, dass noch weitere virale Gene, die in den Adenoviren der ersten Generation noch enthalten sind, entfernt wurden. Dies führt zu einer deutlich verlängerten sowie erhöhten Expression des therapeutischen Gens (Kay et al., 2001). Man bezeichnet diese Vektoren auch als Adenoviren der dritten Generation oder sog. „gut-less“ Adenoviren. Ein Nachteil dieser „gut-less“ Adenoviren besteht allerdings darin, dass diese deletierten Gene für die Replikation der viralen Nukleinsäure bzw. zur Bereitstellung der Proteine für die Generierung des Viruskapsids essentiell sind und daher „in trans“ zur Verfügung gestellt werden müssen. Das kann entweder durch die Generierung einer Zelllinie, in die alle diese Gene eingebracht wurden, oder durch die Bereitstellung eines sog. Helfer-Virus erreicht werden. Beide Techniken sind jedoch noch nicht ausgereift und machen eine weitere Optimierung erforderlich.

Eine interessante Variante zu den oben beschriebenen Retroviren stellt der Einsatz von sog. „pseudotypisierten“ Retroviren dar. Diese Gentransfer-Konstrukte wurden auf der Basis des Human Immunodeficiency Virus (HIV)- bzw. seines nahen Verwandten aus Affen, des Simian Immunodeficiency Virus (SIV)-Genoms generiert (Kay et al., 2001). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die ursprüngliche Hüllmembran der Retroviren durch eine andere Membran auf der Basis des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) ersetzt wurde. Dies führt zu einem wesentlich breiteren Infektionsspektrum und einer höheren Stabilität der „pseudotypisierten“ Viren. Erste therapeutische Ansätze für eine Applikation mit den „Pseudotypen“ wurden bereits an einem Tiermodell, welches die

Degeneration von Photorezeptoren erforscht, berichtet (Takahashi et al., 1999). Auch für den Gentransfer in die Kornea mit Hilfe von Pseudotypen liegen bereits erste Ergebnisse vor (Wang et al., 2000).

Trotz der vielen offenen Fragen, die die Anwendung der Gentherapie bisher aufgeworfen hat, wird die Gentherapie mit viralen Vektoren sicherlich in der Zukunft in der Behandlung von Patienten eine wichtige Rolle spielen. Vor allem in der Kombination der genterapeutischen Anwendung mit anderen immunmodulierenden Therapien ist hier die Zukunft zu sehen. Die Entwicklung besserer Vektoren mit Hilfe der modernen Molekularbiologie ist jedoch eine wichtige Voraussetzung für eine breitere und wirkungsvollere Anwendung der Gentherapie am Menschen.

Neben der direkten Anwendung von viralen Vektoren wird auch die Anwendung von Therapien auf der Basis von gentechnisch modifizierten Zellen immer aktueller werden. Hier ist besonders die Therapie mit aus dem Blut generierten Stammzellen denkbar. Aber auch die Anwendung von regulatorischen T-Zellen aus Ansätzen wie oben beschrieben könnte neue Strategien für die Transplantationsmedizin aufzeigen, zumindest für die immunmodulierende Kombinationstherapie.

Abkürzungen

MAk	Monoklonaler Antikörper
MHC	Major histocompatibility complex
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Zitierte eigene Arbeiten (in chronologischer Reihenfolge):

- ONODERA, K., VOLK, H.-D., RITTER, T., AND KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. Thymus requirement and antigen dependency in the „infectious“ tolerance pathway in transplant recipients. *J. Immunol.* 1998. **160**: 5765-5772. IF: 7,1
- RITTER, T., RISCH, K., SCHRÖDER, G., KOLLS, J., SIEGLING, A., GRASER, E., REINKE, P., BROCK, J., LEHMANN, M., VOLK, H.-D. Intra-graft overexpression of IL-4 is neither sufficient nor essential for tolerance induction in high-responder strain combination. *Transplantation* 1999. **68**: 1427-1431. IF: 3,5
- AMERSI, F., BUELOW, R., KATO, H., ZAKY J., MELENIK, J., LASSMAN, C.R., KE, B., COITO, A.J., RITTER, T., VOLK, H.-D., BUSUTTIL, R.W., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rats from ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest* 1999. **104**: 1631-1639. IF: 9,3
- KATO, H., RITTER, T., KE, B., MURAKAMI, M., KUSANO, M., BUSUTTIL, R.W., KUPIEC-WEGLINSKI J.W. Adenovirus-mediated gene transfer of IL-4 prolongs rat renal allograft survival and inhibits the p21(ras)-activation pathway. *Transplant. Proc.* 2000. **32**: 245-246. IF: 0,74
- SCHRÖDER G., RISCH, K., NIZZE, H., KOLLS, J., REINKE, P., BROCK, J., LEHMANN, M., VOLK H.-D., RITTER, T. Immune response after adenoviral gene transfer in syngeneic heart transplants: effects of anti-CD4 mab therapy. *Transplantation* 2000. **70**: 191-198. IF: 3,5
- PLEYER, U., BERTELMANN, E, RIECK, P., HARTMANN, C., VOLK, H.-D., RITTER, T. Survival of corneal allografts following adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2000. **238**: 531-536. IF: 0,8
- HAMMER, M., FLUGEL, A., SEIFERT, M., LEHMANN, M., BRANDT, C., VOLK, H.-D., RITTER, T. Potential of allospecific gene-engineered T-cells in transplantation gene therapy: Specific T-cell activation determines transgene expression in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 2000. **11**: 1303-1312. IF: 8,0
- KE, B., RITTER, T., KATO, H., ZHAI, Y., LI, J., BUSUTTIL, R.W., LEHMANN M., VOLK, H.-D., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. Regulatory cells potentiate the efficacy of IL 4 gene transfer in transplant recipients by upregulating Th2-dependent expression of protective molecules in the infectious tolerance pathway. *J Immunol.* **164**: 5739-5745, 2000. IF: 7,1

- RITTER, T., SCHRÖDER, G., RISCH, K., VERGOPOULOS, A., SHEAN, M.K., KOLLS, J., BROCK, J., LEHMANN, M., VOLK, H.-D. Ischemia/Reperfusion injury mediated downregulation of adenovirus-mediated gene expression in a rat heart transplantation is inhibited by co-application of a TNFRp55-Ig chimeric construct. *Gene Ther.* 2000. **7**: 1238-1243. IF: 5,4
- RITTER, T., BRANDT, C., PROESCH, S., VOGT, K., KOLLS, J., VOLK, H.-D. Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-promoter activity in human cell lines. *Cytokine* 2000. **12**: 1163-1170. IF: 2,0
- HAMMER, M.H., ZHAI, Y., KATORI, M., RITTER, T., VOLK, H.-D., COITO, A.J., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. Homing of in vitro generated antigen-reactive CD4+ T lymphocytes to renal allografts is $\alpha 4\beta 1$ - but not $\alpha L\beta 2$ -integrin dependent. *J. Immunol.* 2001. **166**: 596-601. IF: 7,1
- KE, B., SHEN, X.D., MELINEK, J., GAO, F., RITTER, T., VOLK, H.-D., BUSUTTIL, R.W., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. Heme oxygenase-1 gene therapy: a novel immunomodulatory approach in liver allograft recipients? *Transplant Proc.* 2001. **33**: 581-582. IF: 0,74
- HAMMER, M.H., SCHRÖDER, G., FLÜGEL, A., RISCH, K., VOLK, H.-D., LEHMANN, M., RITTER, T. Antigen-dependent transgene expression in transplantation: a novel approach using gene-modified T lymphocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002. **13**: 511-518. IF: 6,8
- PLEYER, U., LEMKE, M., VOGT, K., HARTMANN, C., VOLK, H.-D., RITTER, T. Adenovirus-mediated gene transfer of Th2-cytokines prolongs allograft survival in experimental keratoplasty. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- SAWITZKI, B., AMERSI, F., RITTER, T., FISSER, M., SHEN, X.-D., BUSUTTIL, R., VOLK, H.-D., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. Upregulation of Bag-1 by ex-vivo gene transfer protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- YANG, J., REUTZEL-SELKE, A., KÖHLER, S., JURISH, A., TULLIUS, S.G., VOLK, H.-D., RITTER, T. Adenovirus-mediated gene transfer immunoregulatory molecules in a rat model of chronic allograft rejection improves long-term renal allograft outcome. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- KATO, H., BACHMANN, U., FIEBLINGER, C., KE, B., BUSUTTIL, R.W., VOLK, H.-D., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W., RITTER, T. Gene transfer of interleukin-4 prolongs rat renal allograft survival and inhibits p21^{ras} activation pathway. Zur Veröffentlichung eingereicht

Zusammenfassungen:

- PLEYER, U., RIECK, P., RITTER, T., HARTMANN C. Immunreaktion nach perforierender Keratoplastik. II. Prävention und Therapie. Ophthalmologie 1998. **95**: 444-459.
- PLEYER, U., RITTER, T., VOLK, H.-D. Immune tolerance and gene therapy in transplantation. Immunology Today 2000. **21**: 12-14. IF: 15,4
- PLEYER, U., DANNOWSKI, H., RESZKA, R., VOLK, H.-D., HARTMANN, C., RITTER, T. Gentherapie in der Ophthalmologie. Übersicht über Perspektiven und Möglichkeiten für Erkrankungen der Kornea. Klin. Monatsblätter für Augenheilkunde 2001. **218**: 140-147.
- PLEYER, U., DANNOWSKI, H., VOLK, H.-D., RITTER, T. Invited review: Corneal allograft rejection: Current understanding. Ophthalmologica, 2001. **215**: 254-262.
- SAWITZKI, B., LEHMANN, M., RITTER, T., GRASER, E., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W., VOLK, H.D. Regulatory tolerance-mediating T cells in transplantation tolerance. Transplant Proc. 2001. **33**: 2092-2093. IF: 0,74
- RITTER, T., LEHMANN, M., VOLK, H.-D. Invited review: Improvements in gene therapy: Averting the immune response to adenoviral vectors. Biodrugs. In press. IF: 0,5

Zitierte Abstracts:

- THOMAS RITTER, CHRISTINE BRANDT; BIRGIT SAWITZKI, MARKUS H. HAMMER AND HANS-DIETER VOLK. T-lymphocytes transduced with MoMuLV-based retrovirus expressing Interleukin-10 modulate allogeneic immune responses. American Society of Gene Therapy, 2001.

Zitierte Fremdliteratur:

- AKBAR, A.N., SALMON, M. Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T-cell death. *Immunology Today* **18**: 72-76, 1997.
- BACH, F.H., FERRAN, C., HECHENLEITNER, P., MARK, W., KOYAMADA, N., MIYATAKE, T., WINKLER, H., BADRICHANI, A., CANDINAS, D., HANCOCK, W.W. Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat Med.* **3**: 196-204, 1997.
- BEMELMAN, F., HONEY, K., ADAMS, E., COBBOLD, S., WALDMANN, H. Bone marrow transplantation induces either clonal deletion or infectious tolerance depending on the dose. *J Immunol.* **160**: 2645-2658, 1998.
- BILBAO, G., CONTRERAS, J.L., GOMEZ-NAVARRO, J., ECKHOFF, D.E., MIKHEEVA, G., KRASNYKH, V., HYNES, T., THOMAS, F.T., THOMAS, J.M., CURIEL, D.T. Genetic modification of liver grafts with an adenoviral vector encoding the Bcl-2 gene improves organ preservation. *Transplantation* **67**: 846-854, 1999.
- BLAESE, R.M., CULVER, K.W., MILLER, D., CARTER, C., FLEISCHER, T., CLERICI, M., SHEARER, G., CHANG, L., CHIANG, Y., TOLSTHEV, P., GRENNBLATT, J.J., ROSENBERG, S.A., KLEIN, H., BERGER, M., MULLEN, C.A., RAMSEY, W.J., MUUL, L., MORGAN, R.A., ANDERSON, W.F. T-lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* **270**: 475-477, 1995.
- BRENNER, M. Gene transfer by adenovectors. *Blood.* **94**: 3965-3967, 1999.
- BROMBERG, J.S., DEBRUYNE, L.A., QIN, L. Interactions between the immune system and gene therapy vectors: bidirectional regulation of response and expression. *Adv Immunol.* 1998;**69**: 353-409. Review.
- CAMPOS, L., NAJI, A., DELI, B.C., KERN, J.H., KIM, J.I., BARKER, C.F., MARKMANN, J.F. Survival of MHC-deficient mouse heterotopic cardiac allografts. *Transplantation* **59**:187-191, 1995.
- CASSATELLA, M.A., MEDA, L., BONORA, S., CESKA, M., CONSTANTIN, G. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leucocytes. Evidence for an autocrine role of tumor

- necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* **178**: 2207-2211, 1993.
- CHEN, Z., COBBOLD, S., METCALFE, S., WALDMANN, H. Tolerance in the mouse to major histocompatibility complex-mismatched heart allografts, and to rat heart xenografts, using monoclonal antibodies to CD4 and CD8. *Eur J Immunol* **22**: 805-180, 1992.
- COBBOLD, S., WALDMANN, H. How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for Infectious Tolerance? *Annual Reviews Immunology* **16**: 619-644, 1998.
- CORY, S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annual Reviews Immunology* **13**: 513-543, 1995.
- DAVID, A., CHETRIT, J., GUILLOT, C., TESSON, L., HESLAN, J.M., CUTURI, M.C., SOULILLOU, J.P., ANEGON, I. Interleukin-10 produced by recombinant adenovirus prolongs survival of cardiac allografts in rats. *Gene Ther.* **7**: 505-510, 2000.
- DAVIES, J.D., MARTIN, G., PHILLIPS, J., MARSHALL, S.E., COBBOLD, S.P., WALDMANN, H. T cell regulation in adult transplantation tolerance. *J Immunol* **157**: 529-533, 1996.
- DE WAAL MALEFYT, R., ABRAMS, J., BENNETT, B., FIGDOR, C.G., DE FRIES, J.E. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* **174**: 1209-1220, 1991a.
- DE WAAL MALEFYT, R., HAANEN, J., SPITS, H., RONCAROLO, M.G., TE FELDE, A., FIGDOR, C., JOHNSON, C., KASTELEIN, R., YSSEL, H., DE FRIES, J.E. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* **174**: 915-924, 1991b.
- FOWELL, D., MASON, D. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4⁺ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med.* **177**: 627-636, 1993.
- FLÜGEL, A., WILLEM, M., BERKOWICZ, T., WEKERLE, H. Gene transfer into CD4⁺ T lymphocytes: Green fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses. *Nature Med* **7**: 843-847, 1999.
- GERMANN, T., GATELY, M.K., SCHOENHAUT, D.S., LOHOFF, M., MATTNER, F., FISCHER, S., JIN, S.C., SCHMITT, E., RUDE, E. Interleukin-12/Tcell stimulating

- factor, a cytokine with multiple effects on T helper type1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur J Immunol* **23**: 1762-1768, 1993.
- GERSHON, R.K. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev.* **26**:170-185, 1975.
- GOODE, H.F., WEBSTER, N.R., HOWDLE, P.D., LEEK, J.P., LODGE, J.P., SADEK, S.A., WALKER, B.E. Reperfusion injury, antioxidants and hemodynamics during orthotopic liver transplantation. *Hepatology* **19**: 354-359, 1994.
- GROUX, H., O'GARRA, A., BIGLER, M., ROULEAU, M., ANTONENKO, S., DE VRIES, J.E., RONCAROLO, M.G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**: 737-742, 1997.
- GROUX, H., POWRIE, F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol Today* **20**: 442-445, 1999.
- HARA, M., KINGSLEY, C.I., NIIMI, M., READ, S., TURVEY, S.E., BUSHELL, A.R., MORRIS, P.J., POWRIE, F., WOOD, K.J. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol.* **166**:3789-96, 2001.
- HAYRY, P., ISONIEMI, H., YILMAZ, S., MENNANDER, A., LEMSTROM, K., RAISANEN-SOKOLOWSKI, A., KOSKINEN, P., USTINOV, J., LAUTENSCHLAGER, I., TASKINEN, E., ET AL. Chronic allograft rejection. *Immunol Rev.* **134**: 33-81, 1993.
- HSIEH, C.S., MACATONIA, S.E., TRIPP, C.S., WOLF, S.F., O'GARRA, A., MURPHY, K.M. Listeria-induced Th1 development in $\alpha\beta$ -TCR transgenic CD4+ T cells occurs through macrophage production of IL-12. *Science* **260**: 547-551, 1993.
- ISOBE, M., SUZUKI, J., YAMAZAKI, S., YAZAKI, Y., HORIE, S., OKUBO, Y., MAEMURA, K., YAZAKI, Y., SEKIGUCHI, M. Regulation by differential development of Th1 and Th2 cells in peripheral tolerance to cardiac allograft induced by blocking ICAM-1/LFA-1 adhesion. *Circulation.* **96**: 2247-2253, 1997.
- JOO, C., CHO, K., KIM, H., CHOI, J.S., OH, Y.J. Protective role for bcl-2 in experimentally induced cell death of bovine corneal endothelial cells. *Ophthalmic Res.* **31**: 287-296, 1999.
- KAY, M.A., GLORIOSO, J.C., NALDINI, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.* **7**: 33-40, 2001.
- KENNEDY, M.K., PICHA, K.S., SHANEBECK, K.D., ANDERSON, D.M., GRABSTEIN, K.H. Interleukin-12 regulates the proliferation of Th1, but not Th2 or Th0, clones. *Eur J Immunol* **24**: 2271-2278, 1994.

- KHOURY, S., SAYEGH, M.H., TURKA, L.A. Blocking costimulatory signals to induce transplantation tolerance and prevent autoimmune disease. *Int Rev Immunol* **18**: 185-199, 1999.
- KING, C., MUELLER HOENGER, R., MALO CLEARY, M., MURALI-KRISHNA, K., AHMED, R., KING, E., SARVETNICK, N.. Interleukin-4 acts at the locus of the antigen-presenting dendritic cell to counter-regulate cytotoxic CD8+ T-cell responses. *Nat Med.* **7**: 206-214, 2001.
- KLEBE, S., SYKES, P.J., COSTER, D.J., KRISHNAN, R., WILLIAMS, K.A. Prolongation of sheep corneal allograft survival by ex vivo transfer of the gene encoding interleukin-10. *Transplantation.* **71**: 1214-1220, 2001.
- KNORR, D. Serious adverse event on NIH human gene transfer protocol #9512-139. A phase I study of adenovector mediated gene transfer to liver in adults with partial ornithine transcarbamylase deficiency. Memorandum of 21 September 1999, office of recombinant DNA activities at NIH, 1999.
- KROEMER, G., ZAMZAMI, N., SUSIN, S.A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* **18**: 44-51, 1995.
- LEHMANN, M., KUTTLER, B., SIEGLING, A., GORDALLA, A., RIEDEL, H., LACHA, J., HAHN, H.J., BROCK, J., VOLK, H.D. Characterization of the anti-CD4-induced permanent acceptance of rat renal allografts. *Transplant Proc.* **25**: 2859-2860, 1993.
- LEHMANN, M., GRASER, E., RISCH, K., HANCOCK, W.W., MÜLLER, A., KUTTLER, B., HAHN, H.J., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W., BROCK, J., VOLK, H.D. Anti-CD4 monoclonal antibody-induced allograft tolerance in rats despite persistence of donor-reactive T cells. *Transplantation* **64**: 1181-1187, 1997
- MATTNER, F., FISCHER, S., GUCKES, S., JIN, S., KAULEN, H., SCHMITT, E., RUDE, E., GERMANN, T. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of interleukin-12 heterodimer. *Eur J Immunol* **23**: 2202-2207, 1993.
- MOSMANN, T.R. AND COFFMANN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to a different functional properties. *Annual Reviews Immunology* **7**:145-173, 1989.
- MOTTRAM, P.L., MIRISKLAVOS, A., DUMBLE, L.J., CLUNIE, G.J. T suppressor cells induced by transfusions and cyclosporine. Studies in the murine cardiac allograft model. *Transplantation* **50**: 1033-1037, 1990.

- MUELLER, R., DAVIES, J.D., KRAHL, T., SARVETNICK, N. IL-4 expression by grafts from transgenic mice fails to prevent allograft rejection. *J. Immunol.* **159**: 1599-1603, 1997.
- NAGATA, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**: 355-365, 1997.
- ONODERA, K., LEHMANN, M., AKALIN, E., VOLK, H.D., SAYEGH, M.H., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. Induction of „infectious“ tolerance to MHC-incompatible cardiac allografts in CD4 monoclonal antibody-treated sensitized rat recipients. *J. Immunol.* **157**: 1944-1950, 1996.
- OTTERBEIN, L.E., KOLLS, J.K., MANTELL, L.L., COOK, J.L., ALAM, J., CHOI, A.M. Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J Clin Invest.* **103**: 1047-1054, 1999.
- PEARSON, T.C., MADSEN, J.C., LARSEN, C.P., MORRIS, P.J., WOOD, K.J. Induction of transplantation tolerance in adults using donor antigen and anti-CD4 monoclonal antibody. *Transplantation* **54**: 475-483, 1992.
- PILEGGI, A., MOLANO, R.D., BERNEY, T., CATTAN, P., VIZZARDELLI, C., OLIVER, R., FRAKER, C., RICORDI, C., PASTORI, R.L., BACH, F.H., INVERARDI, L. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes.* **50**: 1983-1991, 2001.
- QIN, S., COBBOLD, S.P., POPE, H., ELLIOTT, J., KIOUSSIS, D., DAVIES, J., WALDMANN, H. „Infectious“ transplantation tolerance. *Science* **259**: 974-977, 1993.
- QIN, L., DING, Y., PAHUD D.R., ROBSON, N.D., SHAKED, A., BROMBERG, J.S. Adenovirus-mediated gene transfer of viral interleukin-10 inhibits the immune response to both alloantigen and adenoviral antigen. *Hum Gene Ther* **8**: 1365-1374, 1997.
- QUINN, E.R., LUM, L.G., TREVOR, K.T. T cell activation modulates retrovirus-mediated gene expression. *Hum Gene Ther* **9**:1457-1467, 1998.
- RABINOVITCH, A., SUAREZ-PINZON, W.L., SORENSEN, O., RAJOTTE, R.V., POWER, R.F. Combination therapy with cyclosporine and interleukin-4 or interleukin-10 prolongs survival of syngeneic pancreatic islet grafts in nonobese diabetic mice: islet graft survival does not correlate with mRNA levels of type 1 or type 2 cytokines, or transforming growth factor-beta in the islet grafts. *Transplantation.* **64**: 1525-1531, 1997.

- RALPH, P., NAKOINZ, I., SAMPSON, J.A., FONG, S., LOWE, D., MIN, HY., LIN, L. IL-10, T lymphocyte inhibitor human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* **148**: 808-814, 1992.
- ROSENBERG, S.A. ET AL. Human gene marker/therapy clinical protocols. *Hum Gene Ther.* **11**: 919-979, 2000.
- SIEGLING, A., LEHMANN, M., RIEDEL, H., PLATZER, C., BROCK, J., EMMRICH, F., VOLK, H.D. A nondepleting anti-rat CD4 monoclonal antibody that suppresses T helper 1-like but not T helper 2-like intragraft lymphokine secretion induces long-term survival of renal allografts. *Transplantation* **57**: 464-467, 1994a.
- SIEGLING, A., LEHMANN, M., PLATZER, C., EMMRICH, F., VOLK, H.D. A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine expression in rats. *J Immunol Methods* **177**: 23-, 1994b.
- SMITH, D.K., KORBUTT, G.S., SUAREZ-PINZON, W.L., KAO, D., RAJOTTE, R.V., ELLIOTT, J.F. Interleukin-4 or interleukin-10 expressed from adenovirus-transduced syngeneic islets grafts fails to prevent beta cell destruction in diabetic NOD mice. *Transplantation* **64**: 1040-1049, 1997.
- SOARES, M.P., LIN, Y., ANRATHER, J., CSIZMADIA, E., TAKIGAMI, K., SATO, K., GREY, S.T., COLVIN, R.B., CHOI, A.M., POSS, K.D., BACH, F.H. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* **4**:1073-1077, 1998.
- STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**: 1445-1449, 1995.
- STERMAN, D.H., TREAT, J., LITZKY, L.A., AMIN, K.M., COONROD, L., MOLNAR-KIMBER, K., RECIO, A., KNOX, L., WILSON, J.M., ALBELDA, S.M., KAISER, L.R. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum Gene Ther.* **9**: 1083-1092, 1998.
- SUSIN, S.A., ZAMZAMI, N., CASTEDO, M., HIRSCH, T., MARCHETTI, P., MACHO, A., DAUGAS, E., GEUSKENS, M., KROEMER, G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* **184**: 1331-1341, 1996.
- TAKAHASHI, M., MIYOSHI, H., VERMA, I.M., GAGE, F.H. Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J Virol.* **73**: 7812-7816, 1999.

- TAKAYAMA, S., SATO, T., KRAJEWSKI, S., KOCHER, K., IRIE, S., MILLAN, J.A., REED, J.C. Cloning and functional analysis of bag-1 a novel bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell* **80**: 279-384, 1995.
- TAKEUCHI, T., UEKI, T., SUNAGA, S., IKUTA, K., SASAKI, Y., LI, B., MORIYAMA, N., MIYAZAKI, J-I., KAWABE, K. Murine interleukin-4 heart allograft survival prolonged with down-regulation of the Th1 cytokine mRNA in grafts. *Transplantation* **64**: 152-157, 1997.
- THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-1462, 1995.
- TULLIUS, S.G., REUTZEL-SELKE, A., EGERMANN, F., NIEMINEN-KELHA, M., JONAS, S., BECHSTEIN, W.O., VOLK, H.D., NEUHAUS, P. Contribution of prolonged ischemia and donor age to chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. **11**: 1317-1324, 2000.
- TULLIUS, S.G., NIEMINEN-KELHA, M., REUTZEL-SELKE, A., BACHMANN, U., JONAS, S., PRATSCHKE, J., BECHSTEIN, W.O., VOLK, H., BUELOW, R., NEUHAUS, P., REINKE, P. Improvement of long-term function in renal allografts from 'marginal donors' following the induction of heme-oxygenase-1. *Transplant Proc.* **33**: 1160-1161, 2001.
- VOLK, H.D., REINKE, P. *Transplantation immunology Z Arztl Fortbild Qualitatssich.* **93**: 84-91, 1999.
- WANG, X., APPUKUTTAN, B., OTT, S., PATEL, R., IRVINE, J., SONG, J., PARK, J.H., SMITH, R., STOUT, J.T. Efficient and sustained transgene expression in human corneal cells mediated by a lentiviral vector. *Gene Ther.* **7**: 196-200, 2000.
- WILSON, S.E. AND KIM, W.J. Keratocyte apoptosis: Implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**: 220-226, 1998.
- WOO, J., IYER, S., CORNEJO, M.C., MORI, N., GAO, L., SIPOS, I., MAINES, M., BUELOW, R. Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32). *Transpl Immunol.* **6**: 84-93, 1998.
- YANG, Y., LI, Q., ERTL, H.C., WILSON, J.M. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol.* **69**: 2004-2015, 1995.

ZHAI, Y., SHEN, X.D., LEHMANN, M., BUSUTTIL, R., VOLK, H.D., KUPIEC-
WEGLINSKI, J.W. T Cell Subsets and In Vitro Immune Regulation in "Infectious"
Transplantation Tolerance. *J Immunol.* **167**: 4814-4820, 2001.

Curriculum Vitae

Name: Dr. rer. nat. Thomas Ritter
Daten: geboren am 05.07.1961; in Nürnberg, Deutschland, Verheiratet, zwei Kinder
Funktion: Arbeitsgruppenleiter
Adresse: Institut für Medizinische Immunologie
Medizinische Fakultät Charité-Campus Mitte
Humboldt-Universität zu Berlin,
Monbijoustr. 2a, D-10117 Berlin
T: 030-450524197, Fax: 030-450524907
e-mail: thomas.ritter@charite.de
privat: Calvinstr. 5a, 10557 Berlin

Beruflicher Werdegang:

1981 Abitur am neusprachlichen Willstätter-Gymnasium in Nürnberg
1981-1982 Grundwehrdienst in Ingolstadt
1982- Biologie-/Chemiestudium an der Universität Erlangen-Nürnberg
1988-1989 Diplomarbeit am Inst. für Klinische Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg
1989-1994 Promotion bei der Max-Planck Gesellschaft, Klinische Forschungsgruppen für Rheumatologie und Bindegewebsforschung an der Universität Erlangen-Nürnberg
1994-1995 Postdoktorand am Zentrum für Immunologie in Marseille, Frankreich
seit 1995- Wissenschaftlicher Mitarbeiter (C 1) am Institut für Medizinische Immunologie, Medizinische Fakultät Charité-Campus Mitte, Humboldt-Universität zu Berlin
1999 Organisation der Tagung „Immune Tolerance and Gene Therapy in Transplantation“ in Berlin

Forschungsschwerpunkte:

- i) Molekularbiologie
- ii) Immunologie, Virologie, Gentherapie
- iii) Derzeitiges Forschungsthema: Gentherapie mit viralen Vektoren in der experimentellen Transplantation

Stipendien:

1992 Dreimonatiger Forschungsaufenthalt am „Center of Immunology“ in Marseille, Frankreich in der Arbeitsgruppe von Dr. B. Malissen
1994-1995 Postdoktorand am „Center of Immunology“ in Marseille, Frankreich im Labor von Dr. B. Malissen (EU-Grant)

Derzeitige Drittmittel:

- DFG RI 764/6-1, Beginn 04/01, ca. 140 TDM/Jahr
Thema: „Adoptiver Transfer gentechnisch modifizierter regulatorischer Zellen: Ein neuer Ansatz zur Toleranzinduktion bzw. Toleranzerhaltung“
PL 150/10-1, Beginn 10/0, Mitantagsteller, ca. 120 TDM/Jahr
Thema: „Gentransfer von Zytokin- und Antiapoptose-Proteinen in die Kornea“
- BMBF Förderschwerpunkt „Biologischer Ersatz von Organfunktionen“ ca. 234 TDM/drei Jahre“
Mitantagsteller im Verbund „Modulation der Immunogenität von für die Transplantation vorgesehenen Zellen durch gentherapeutische Verfahren“:
Teilprojekt: „Downregulation of MHC class I antigen expression on islet cells by gene transfer“ (Förderbeginn: 07/01)
- Industrie: Fujisawa, seit 1999, Teilprojekt Ritter/Tullius/Volk, ca. 30 TDM/Jahr
Thema: Improved gene therapy by tacrolimus application
Schering, seit 04/01, ca. 10 TDM/Jahr
Thema: Adenoviraler Gentransfer von Zytokinrezeptoren
- Patente:** Gen-modifizierte T-Zellen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Lehre:

- Seit SS 1996: verantwortliche Durchführung des Praktikums „Einführung in die zelluläre und molekulare Immunologie“ für Biologen nach dem Vordiplom (4 SWS)
- Seit SS 1997: Mitarbeit am Blockpraktikum Mikrobiologie/Virologie/Immunologie für Mediziner (anteilig 1-2 SWS)
- Seit SS 2001: Vorlesung Gentherapie in Medizin und Forschung (1 SWS)
- Seit SS 1996: Betreuung von Diplomanden und Doktoranden

Mitgliedschaften:

- Deutsche Gesellschaft für Immunologie
- Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Gentherapie

Publikationen:

- mehr als 20 Veröffentlichungen in Peer-Review Zeitschriften
- 6 Reviews
- mehrere Manuskripte zur Veröffentlichung eingereicht bzw. in Vorbereitung
- zahlreiche Abstracts bei verschiedenen nationalen/internationalen Kongressen
- zahlreiche Vorträge als eingeladener Gastsprecher

Berlin, Februar 2002