

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	- 1 -
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Einleitung	- 1 -
1.2 Die Bedeutung der Herztransplantation	- 1 -
1.3 Formen der Transplantatabstoßung	- 2 -
1.4 Die Pathomechanismen der Transplantatabstoßung	- 4 -
1.4.1 Die Fremderkennung	- 4 -
1.4.2 Kostimulation	- 5 -
1.4.3 Transkriptionsfaktoren	- 7 -
1.4.4 Die Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1	- 8 -
1.4.4.1 Signal transducer and activator of transcription-1	- 8 -
1.4.4.2 Activation protein-1	- 9 -
1.5 Adhäsionsmoleküle	- 10 -
1.6 Cytokine und Chemokine	- 12 -
1.7 Effektormechanismen der akuten Transplantatabstoßung	- 13 -
1.8 Die Erforschung der Transplantatabstoßung durch den Einsatz von Tiermodellen	- 14 -
1.9 Therapeutische Ansätze zur Modulation der akuten Abstoßung	- 16 -
1.9.1 3-Deazaadenosin (c3Ado)	- 17 -
1.9.2 Inhibition der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1	- 19 -
1.10 Ziel der Studie	- 21 -
2 MATERIAL UND METHODEN	- 22 -
2.1 Materialliste	- 22 -
2.1.1 Verwendete Puffer	- 24 -
2.2 Tierexperimenteller Teil	- 24 -
2.2.1 Versuchstiere	- 24 -
2.2.1.1 Herkunft der Tiere	- 24 -
2.2.1.2 Tierversuchsgenehmigung	- 24 -

2.2.1.3	Tierhaltung.....	- 25 -
2.2.2	Herztransplantation.....	- 25 -
2.2.2.1	Narkose	- 25 -
2.2.2.2	Operationsvorbereitung	- 25 -
2.2.2.3	Operatives Vorgehen.....	- 26 -
2.2.2.3.1	Vorbereitung des Empfängertieres	- 26 -
2.2.2.3.2	Entnahme des Transplantats.....	- 26 -
2.2.2.3.3	Transplantation.....	- 26 -
2.2.2.3.4	Blutflußrichtung im Transplantat.....	- 27 -
2.2.3	Postoperatives Monitoring	- 28 -
2.2.3.1	Transplantatfunktion	- 28 -
2.2.4	Gruppendesign	- 29 -
2.2.4.1	Studie 1: Akute Transplantatabstoßung und c3Ado	- 29 -
2.2.4.2	Studie 2: Akute Transplantatabstoßung und Inhibition der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1.....	- 29 -
2.3	Technik der Asservation	- 32 -
2.4	Histologische Aufarbeitung	- 32 -
2.4.1	Standardfärbung	- 32 -
2.4.2	Immunhistochemische Färbung.....	- 33 -
2.5	Molekularbiologische Untersuchungen.....	- 37 -
2.5.1	Quantifizierung von mRNA durch die semi-quantitative Reverse- Transkriptase (RT) Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):	- 37 -
2.5.1.1	RNA Isolierung	- 37 -
2.5.1.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	- 37 -
2.5.1.3	Herstellung der cDNA (copy-DNA)	- 38 -
2.5.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	- 38 -
2.5.2.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA- Fragmenten.....	- 40 -
2.6	Nachweis von Apoptose	- 41 -
2.6.1	DNA-Laddering	- 41 -
2.6.2	TUNEL-Assay	- 41 -
2.7	Auswertung.....	- 42 -
2.7.1	Funktion des Transplantats	- 42 -
2.7.2	Immunhistochemische Auswertung	- 42 -

2.7.2.1	Adhäsionsmoleküle	- 43 -
2.7.2.2	Zelluläre Infiltration	- 43 -
2.7.3	Semiquantitative RT-PCR.....	- 43 -
2.7.3.1	Verwendung von PBGD als Standardgen	- 44 -
2.7.4	Nachweis der Apoptose	- 45 -
2.8	Statistische Methodik	- 45 -
2.8.1	Verwendete Testverfahren	- 45 -
3	Ergebnisse.....	- 46 -
3.1	Das Tiermodell	- 46 -
3.1.1	Histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Charakterisierung des akuten Abstoßungsmodelles.....	- 47 -
3.1.2	Immunhistochemie.....	- 48 -
3.1.3	Molekularbiologische Untersuchungen	- 50 -
3.2	Modulation der akuten Transplantatabstoßung mit der immunmodulatorischen Substanz c3Ado	- 52 -
3.2.1	Versuchstiere.....	- 52 -
3.2.2	Transplantatüberleben.....	- 54 -
3.2.3	Immunhistochemie.....	- 55 -
3.2.3.1	Adhäsionsmoleküle	- 55 -
3.2.3.2	Zelluläre Infiltration	- 59 -
3.2.4	Molekulbiologische Untersuchungen	- 64 -
3.2.4.1	RT-PCR	- 64 -
3.2.4.1.1	Adhäsionsmoleküle	- 64 -
3.2.4.1.2	Cytokine und Chemokine	- 66 -
3.2.5	Nachweis der Apoptose	- 69 -
3.2.5.1	TUNEL-Reaktion	- 69 -
3.2.5.2	DNA-Laddering.....	- 70 -
3.3	Modulation der akuten Transplantatabstoßung durch den Einsatz von STAT-1- und AP-1-ODN-Decoys	- 72 -
3.3.1	Versuchstiere.....	- 72 -
3.3.2	Transplantatüberleben.....	- 74 -
3.3.3	Nachweis der fluoreszenzmarkierten Decoys im Transplantatgewebe	- 76 -
3.3.4	Immunhistochemie.....	- 77 -

3.3.4.1	Adhäsionsmoleküle	- 77 -
3.3.4.2	Zelluläre Infiltration	- 81 -
3.3.5	Molekularbiologische Untersuchungen	- 87 -
3.3.5.1.1	Adhäsionsmoleküle	- 87 -
4	Diskussion	- 91 -
4.1	Die Wahl des Transplantationsmodelles	- 92 -
4.2	Die Immunmodulation mit c3Ado	- 93 -
4.3	Die Immunmodulation durch den Einsatz von STAT-1- und AP-1-Decoys	- 96 -
4.4	Ausblick	- 100 -
	Literaturverzeichnis	- 102 -
5	Zusammenfassung	- 113 -
6	Summary	- 116 -
7	Danksagung	-118 -

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Prinzip der Kostimulation	- 6 -
Abb. 2: Die trans-Kostimulation	- 7 -
Abb. 3: Schematische Wirkungsweise eines Transkriptionsfaktors	- 8 -
Abb. 4: Das beispielhafte Zusammenspiel der Adhäsionsmoleküle	- 12 -
Abb. 5: Das heterotop transplantierte Herz	- 15 -
Abb. 6: Die Wirkung von c3Ado auf den Methylierungszyklus	- 18 -
Abb. 7: Chirurgische Technik der heterotopen Herztransplantation	- 27 -
Abb. 8: Die Blutflußrichtung im Transplantat	- 28 -
Abb. 9: Wirkungsprinzip der Decoy-Technologie	- 30 -
Abb. 10: Das Prinzip der Immunhistochemie mit der APAAP-Methode	- 34 -
Abb. 11: Die palpierbare Herzaktion der Transplantate	- 46 -
Abb. 12: Transplantatüberleben bei unbehandelten Tieren (Tage post OP)	- 47 -
Abb. 13: Die zelluläre Infiltration im Zeitverlauf der akuten Abstoßung	- 48 -
Abb. 14: Charakterisierung der zellulären Infiltration der Transplantate	- 49 -
Abb. 15: Die relative mRNA-Konzentrationen von ICAM-1 und VCAM-1 im Gesamtlisat	- 50 -
Abb. 16: Die relative mRNA-Konzentrationen von IL-2 und MCP-1 im Gesamtlisat	- 51 -
Abb. 17: Die mittlere Ischämiezeit der Transplantate (c3Ado)	- 52 -
Abb. 18: Das mittlere Gewicht der Tiere (c3Ado)	- 53 -
Abb. 19: Das Transplantatüberleben in Pozent (c3Ado)	- 54 -
Abb. 20: Immunhistochemie c3Ado ICAM-1 (Bilder)	- 56 -
Abb. 21: Immunhistochemie c3Ado ICAM-1	- 57 -
Abb. 22: Immunhistochemie c3Ado VCAM-1	- 58 -
Abb. 23: Immunhistochemie c3Ado MHC II positive Zellen	- 60 -
Abb. 24: Immunhistochemie c3Ado ED 1 (Bilder; Monozyten/Makrophagen)	- 61 -
Abb. 25: Immunhistochemie c3Ado ED-1 (Monozyten/Makrophagen)	- 62 -
Abb. 26: Immunhistochemie c3Ado R73 (T-Zellen)	- 62 -
Abb. 27: Immunhistochemie c3Ado iNOS positive Zellen	- 63 -
Abb. 28: Die PCR-Produkte im direkten Vergleich (Beispiel ICAM-1 Tag1)	- 64 -
Abb. 29: RT-PCR c3Ado Adhäsionsmoleküle	- 65 -
Abb. 30: RT-PCR c3Ado IL-2	- 67 -

Abb. 31: RT-PCR c3Ado MCP-1	- 68 -
Abb. 32: Nachweis der Apoptose durch die TUNEL-Reaktion	- 69 -
Abb. 33: Quantifizierung der Apoptoserate in den Transplantaten	- 70 -
Abb. 34: Nachweis der Apoptose auf molekularer Ebene	- 71 -
Abb. 35: Das Transplantatüberleben der unbehandelten Kontrollgruppen	- 72 -
Abb. 36: Das mittlere Gewicht der Tiere (ODN)	- 73 -
Abb. 37: Transplantatüberleben in Prozent (ODN)	- 75 -
Abb. 38: Nachweis der markierten Decoys in den Transplantaten	- 76 -
Abb. 39: Immunhistochemie ODN ICAM-1 (Bilder)	- 78 -
Abb. 40: Immunhistochemie ODN ICAM-1	- 79 -
Abb. 41: Immunhistochemie ODN VCAM-1	- 80 -
Abb. 42: Immunhistochemie ODN MHC II positive Zellen	- 81 -
Abb. 43: Immunhistochemie ODN ED-1 (Monozyten/Makrophagen)	- 82 -
Abb. 44: Immunhistochemie ODN ED-1 (Monozyten/Makrophagen)	- 83 -
Abb. 45: Immunhistochemie ODN R73 (T-Zellen)	- 84 -
Abb. 46: Immunhistochemie ODN R73 (T-Zellen)	- 85 -
Abb. 47: Immunhistochemie ODN iNOS positive Zellen	- 86 -
Abb. 48: Die PCR-Produkte von ICAM-1 und VCAM-1 am Tag 3	- 87 -
Abb. 49: RT-PCR ODN ICAM-1	- 88 -
Abb. 50: RT-PCR ODN VCAM-1	- 89 -
Abb. 51: Die PCR-Produkte von ICAM-1 und VCAM-1 am Tag 3	- 90 -