

M. G. Krukemeyer<sup>1</sup>, L. Morawietz<sup>1</sup>,  
M. Harren<sup>2</sup>, C. Radke<sup>1</sup>, P. Grätze<sup>1</sup>,  
P. Neuhaus<sup>2</sup>, V. Krenn<sup>1</sup>

## Akkumulation von B-Lymphozyten/ Plasmazellen und Expression des B-Zell- spezifischen Chemokins MIP-3 $\alpha$ /CCR-6 in der akuten Leberreaktion\*

Obwohl Antikörper-vermittelte Mechanismen eine pathogenetische Rolle in der Leberreaktion spielen, existieren keine Daten über B-Lymphozyten und Plasmazellen im rezezierten Lebergewebe. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, in Leberbiopsien der akuten Reaktionsphase (VA-Biopsie) zu analysieren ob 1) CD20+ Lymphozyten nachweisbar sind, 2) durch Vergleich mit Biopsien vor Implantation (A0-Biopsie) zu überprüfen, ob CD20+ B-Lymphozyten CD38+/CD138+ Plasmazellen durch Immigration oder lokale Proliferation (CD20+/Ki67+) intrahepatisch expandieren und 3) ob das B-Zell-spezifische Chemokin MIP-3 $\alpha$  und dessen Rezeptor CCR-6 im Leberparenchym exprimiert werden. Leberbiopsien von 20 Patienten mit akuter Rejektion (RAI-Score: 1-9) wurden mittels immunhistochemischen Einfachfärbungen (CD20, CD38 und CD138) und immunhistochemischen Doppelfärbungen (CD20/Ki67) analysiert. Der Nachweis des B-Zell-spezifischen Chemokins MIP-3 $\alpha$  und seines Rezeptors CCR-6 erfolgte unter Anwendung der indirekten Immunhistochemie und mittels RT-PCR. In sämtlichen VA-Biopsien konnten CD20+ B-Lymphozyten, CD38+/CD138+ Plasmazellen nachgewiesen werden, diese waren überwiegend in den Portalfeldern, selten perisinoidal/perizentral lokalisiert. Der Vergleich der A0-Biopsien mit den VA-Biopsien zeigte einen signifikanten Unterschied in der Anzahl CD20+ Lymphozyten ( $p = 0,002$ ) und CD38+/CD138+ Plasmazellen ( $p = 0,022$ ) und keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,262$ ) zwischen der Anzahl der proliferierenden B-Lymphozyten (CD20+/Ki67+). MIP-3 $\alpha$ + und CCR-6+ Zellen waren in allen VA-Biopsien in den Portalfeldern (Granulozyten, mononukleären Zellen) mittels indirekter Immunhistochemie und RT-PCR-Analyse nachweisbar. Die signifikante Zunahme von CD20+ B-Lymphozyten CD38+/CD138+ Plasmazellen in der akuten Rejektion ohne signifikante Zunahme der Zellproliferation legt nahe, dass nicht eine lokale Proliferation, sondern die Immigration von B-Lymphozyten und Plasmazellen die entscheidende Rolle für die B-Zellexpansion in der akuten Leberreaktion darstellt. Der Nachweis des B-Zell-spezifischen Chemokins MIP-3 $\alpha$  und des dazugehörigen Rezeptors CCR-6 in den inflammatorischen Zellen lässt den Schluss zu, dass dieses Chemokin/Rezeptor an der Rekrutierung von B-Lymphozyten und Plasmazellen beteiligt ist. Diese Daten legen die Bedeutung eines intrahepatischen, antikörpervermittelten Pathogenesemechanismus in der akuten Leberreaktion nahe.

### Schlüsselwörter:

Lebertransplantation, Leberreaktion, B-Lymphozyten, Plasmazellen, MIP-3 $\alpha$ , CCR-6

<sup>1</sup>Institut für Pathologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Universitätsklinikum Campus Charité Mitte, Berlin

<sup>2</sup>Klinik für Chirurgie, Humboldt-Universität zu Berlin, Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Berlin

Krukemeyer MG, Morawietz L, Harren M, Radke C, Grätze P, Neuhaus P, Krenn V (2003) Akkumulation von B-Lymphozyten/Plasmazellen und Expression des B-Zell-spezifischen Chemokins MIP-3 $\alpha$ /CCR-6 in der akuten Leberreaktion. Tx Med 15: 40-46

\*Tissue Arrays von chronischer und akuter Leberreaktion sind bei – oligene GmbH – erwerbbar.

## **B-Lymphocyte/Plasma Cell Accumulation and Expression of the B-Cell Specific Chemokine MIP-3 $\alpha$ /CCR-6 in Acute Liver Allograft Rejection**

*Although humoral antibody mediated mechanisms play a role in liver allograft rejection, no data exist concerning B-lymphocytes and plasma cells. The aim of this study was to analyse whether 1) B-lymphocytes and plasma cells are present in biopsies of acute graft rejection. 2) B-lymphocytes and plasma cells are expanded by local proliferation or immigration and 3) whether the B-cell specific chemokine MIP-3 $\alpha$ /CCR-6 is expressed in liver tissue. Biopsies of 20 patients with acute graft rejection (AR-biopsies) were analysed by immunohistochemistry (CD20, CD38, CD 138, CD 20/Ki67, MIP-3 $\alpha$ , CCR-6) and by RT-PCR (MIP-3 $\alpha$ , CCR-6). In all biopsies with acute graft rejection (RAI-Score 1-9) CD20+ B-lymphocytes and CD38+/138+ plasma cells could be detected, MIP-3 $\alpha$  or CCR-6 expression could be observed in all AR-biopsies on granulocytes and mononuclear cells, which was confirmed by RT-PCR. In comparison of AR-biopsies with AO-biopsies (biopsies taken before transplantation) there was a significant increase in the quantity of CD20+ B-lymphocytes ( $p=0,002$ ) and CD38+/CD138+ plasma cells ( $p=0,022$ ) whereas no significant differences could be observed in the quantity of proliferating B-lymphocytes ( $p=0,262$ ). These data suggest that local B-lymphocyte/plasma cell expansion occurs not by proliferation but by immigration. The local expression of MIP-3 $\alpha$  and CCR-6 indicates that this chemokine is involved in B-cell accumulation during acute graft rejection and suggests a local, antibody mediated pathomechanism in acute liver allograft rejection.*

### **Key words:**

*liver transplantation, transplant rejection, B-lymphocytes, plasma cells, MIP-3 $\alpha$ , CCR-6*

## **Einleitung**

Der akuten Leberrejektion liegt eine portale entzündliche Infiltration zugrunde, welche in einem direkten Zusammenhang mit dem Schweregrad des klinischen Abstoßungsgeschehens steht (4). Durch lokale Freisetzung T-Zell-spezifischer Chemokine (7) erfolgt die Rekrutierung von T-Lymphozyten. Die Interaktion von infiltrierenden T-Lymphozyten mit ortständigen Zellen (2) führt durch Aktivierung und Proliferation (5) zur Entstehung eines zellulären Responses mit Destruktion des Leberparenchyms. Obwohl CD3+ T-Lymphozyten den prädominanten Anteil des entzündlichen Infiltrates darstellen (13), spielen neben zellulären Mechanismen auch humorale, antikörper-

vermittelte Mechanismen eine pathogenetische Rolle (17, 18). Antikörperproduzierende Zellen können zusätzlich durch die Fähigkeit der Antigenpräsentation an der Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens beteiligt sein. Es ist daher verwunderlich, dass bezüglich der humanen Leberrejektion nur sehr wenige Daten über intrahepatische B-Lymphozyten (5) und keine Daten über die pathogenetische Bedeutung antikörperproduzierender Plasmazellen vorliegen.

Ziel dieser Untersuchung war es daher zu klären, ob in der akuten Rejektion B-Lymphozyten und Plasmazellen in Biopsaten nachweisbar sind, ob eine lokale Proliferation von B-Lymphozyten erfolgt und ob das erst kürzlich charakterisierte B-Zell-spezifische Chemokin

MIP-3 $\alpha$  und sein Rezeptor CCR 6 (11) im Parenchym der rezezierten Leber exprimiert werden.

## **Material und Methoden**

### *Patienten und Gewebe*

Leberbiopsien wurden durch perkutane Biopsien von 20 Patienten (11 Frauen, 9 Männer, Alter: 1-66 Jahre) im Rahmen der Leberrejektionsdiagnostik (VA-Biopsie) gewonnen. Das Zeitintervall zwischen Implantation und VA-Biopsie betrug 1-2 Wochen ( $n=17$ ) und 3, 5 und 9 Wochen. Von 15 der Patienten standen zusätzlich Gewebe vor der Leberimplantation (AO-Biopsien) zur Verfügung. In allen Fällen wurde eine orthotope Lebertransplantation durchgeführt, die Indikationen für die Transplantationen waren: hepatozelluläres Karzinom, primäre biliäre Zirrhose, primär sklerosierende Cholangitis, Zystenleber und alkoholische Zirrhose. Cytomegalie- und Epstein-Barr-Virus-Infektionen wurden mittels RT-PCR (aus VA-Biopsie) ausgeschlossen. Unmittelbar nach der Punktion wurden die Biopsien in 4%igem gepufferten Formalin fixiert, etwa 1/5 der Leberstanzen wurde für RT-PCR-Analyse kryoasserviert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die histopathologische Beurteilung der Rejektion erfolgte durch C.R. gemäß des RAI-Scores (4).

### *Immunhistochemie*

#### *Immunhistochemische Einfachfärbung (CD20, CD38, CD138)*

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mittels der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt (LSAB-Kit, DAKO, Dänemark): Freie Bindungsstellen am enzymgekoppelten (labeled) Streptavidin (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase oder Peroxidase) binden dabei an das Biotin, welches an den Sekundärantikörper gekoppelt ist. Als Chromogen für die Reaktion mit alkalischer Phosphatase wurde Fuchsin (DAKO, Dänemark) verwendet, für die Reaktion mit Peroxidase wurde DAB (3,3 Diaminobenzidin) (DAKO, Dänemark) als Chromogen eingesetzt. Die Primärantikörper wurden in entsprechender Verdünnung

verwendet: CD20 (DAKO, Dänemark) 1:100; CD38 (NOVOCASTRA, UK) 1:100; CD138 (DAKO, Dänemark) 1:100. Eine Hitzedemaskierung im Druckkochtopf (Citratpuffer, pH 6) erfolgte für alle Antikörper, abschließend wurde eine Kernfärbung nach Mayer durchgeführt. In chronisch entzündlichen Geweben sowie im Blut wird CD38 auf B-Lymphozyten (Gedächtniszellen, Keimzentrumzellen) und Plasmazellen, CD138 ausschließlich auf Plasmazellen exprimiert (1).

#### Immunhistochemische Doppelfärbung (Ki67/CD20)

Die Doppelfärbung wurde mit dem ENVISION-Doublestain-System (DAKO, Dänemark) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt: Die Schnitte wurden sequentiell mit anti-CD20 (monoklonal, DAKO, Dänemark) 1:100 und anti-Ki67-Antikörpern (polyklonal, DAKO, Dänemark) 1:50 behandelt. Eine Hitzedemaskierung erfolgte im Druckkochtopf (in Citratpuffer).

#### RT-PCR

Um aus den kryoasservierten Leberstanzen RNA zu gewinnen, wurden die Proben (n=2) nach Zugabe von Lysis Puffer (RLT-Puffer; QIAGEN mit  $\beta$ -Mercaptoethanol) homogenisiert und anschließend die Gesamt-RNA isoliert (RNeasy Mini Kit, QIAGEN). Die Menge der extrahierten Gesamt-RNA wurde photometrisch ermittelt. Die Reverse Transkription und die PCR wurden sequentiell im selben Tube durchgeführt (OneStep RT-PCR Kit; QIAGEN). Als Ausgangsmenge wurden jeweils 25ng RNA verwendet. Für die Reverse Transkription wurde der Ansatz 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Es folgte eine Inkubation bei 95°C für 15 Minuten um die HotStarTaq Polymerase zu aktivieren, die Transkriptasen zu inaktivieren und die cDNA zu denaturieren. Während der Amplifikation wurden folgende Schritte in 45 Zyklen wiederholt: 94°C für 30 Sekunden (Denaturierung), 52°C (MIP-3 $\alpha$ ), 56°C (CCR6) für 30 Sekunden (Annealing) und 72°C für 1 Minute (Extension). Eine finale Extension erfolgte bei 72°C für 10 Minuten. Primer Sequenzen: MIP-3 $\alpha$ : 5'-TTG GAT CCT GCT GCT ACT CCA CCT CTG-3' und 5'-TTC TCG AGT ATA TTT CAC CCA AGT

CTG TTT T-3'; CCR6: 5'-TTG GAT CCG TGG GGG CTG TCA GTC ATC AT-3' und 5'-TTC TCG AGC TGC CCA ATA AAA GCG TAG A-3'.  $\beta$ -Actin wurde als interne Kontrolle verwendet. Die PCR-Produkte wurden in 1,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert.

#### Histopathologische Auswertung und statistische Analyse

Die histopathologische Analyse erfolgte durch eine für die Rejektionsdiagnostik spezialisierte Pathologin (C.R.). Die Analyse der immunhistochemisch positiven Zellen wurde von zwei Beobachtern (V.K. und L.M.) durchgeführt (Leitz, DMRBE). Es wurden in sämtlichen Fällen 5 Portalfelder analysiert, die immunhistochemisch positiven Zellen gezählt und das arithmetische Mittel gebildet. Der t-Test für verbundene Stichproben wurde herangezogen, um die Dichte des Infiltrats in A0- und VA-Biopsien zu vergleichen. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

## Resultate

**CD20+ B-Lymphozyten in A0-Biopsien:** In sämtlichen Fällen waren CD20+ B-Lymphozyten in den A0-Biopsien nachweisbar (Mittelwert: 5,1 Zellen pro Portalfeld, Abb. 1). CD20+ B-Lymphozyten waren prädominant in den Portalfeldern lokalisiert und wiesen eine diffuse Verteilung auf. Ganz vereinzelt fanden sich CD20+ B-Lymphozyten in einer perisinuidalen sowie perivenösen Lokalisation (Abb. 2a).

**CD20+ B-Lymphozyten in VA-Biopsien:** In sämtlichen Fällen waren CD20+ B-Lymphozyten in den Biopsien nachweisbar (Mittelwert: 21,2 Zellen pro Portalfeld, Abb. 1). CD20+ B-Lymphozyten zeigten eine prädominant portale Verteilung mit Ausbildung kleiner bis mittelgroßer lymphozytärer Aggregate, follikelartige Strukturen waren nicht nachweisbar. Vereinzelt stellten sich überwiegend gruppiert gelegene CD20+ Lymphozytenaggregate in einer perisinuidalen und perivenösen Lage dar (Abb. 2b).

**CD38+/CD138+ Plasmazellen in A0-Biopsien:** In sämtlichen Fällen waren CD38+/CD138+ Plasmazellen in den Biopsien nachweisbar (Mittelwert: 7,2 Zellen pro Portalfeld, Abb. 1). Diese waren ebenso wie die CD20+ B-Lymphozyten prädominant in den Portalfeldern

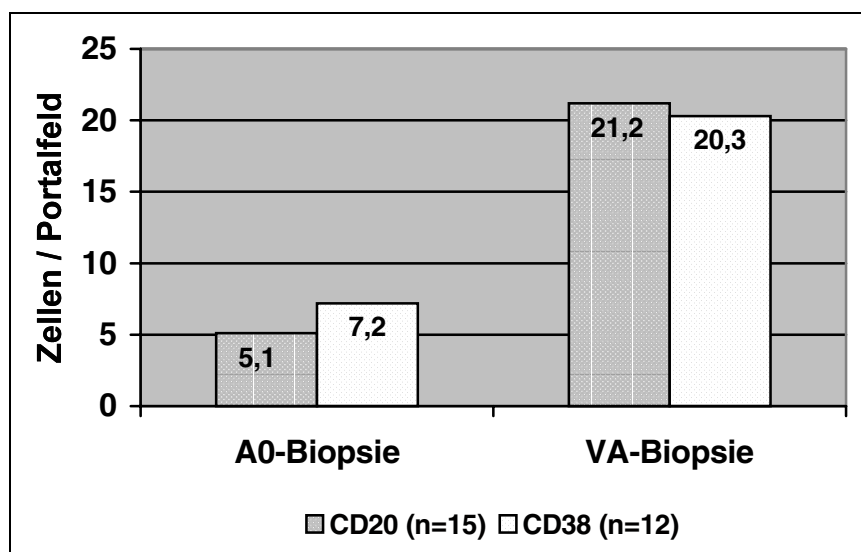


Abb. 1: Anzahl CD20+ bzw. CD38+/CD138+ Zellen pro Portalfeld zum Zeitpunkt der Transplantation (A0-Biopsie) und in der akuten Rejektion (VA-Biopsie). Die Dichte des B-Zell- / Plasmazell-Infiltrats ist zum Zeitpunkt der Rejektion signifikant höher (t-Test für verbundene Stichproben:  $p=0,002$  für CD20+,  $p=0,022$  für CD38+/CD138+ Zellen)

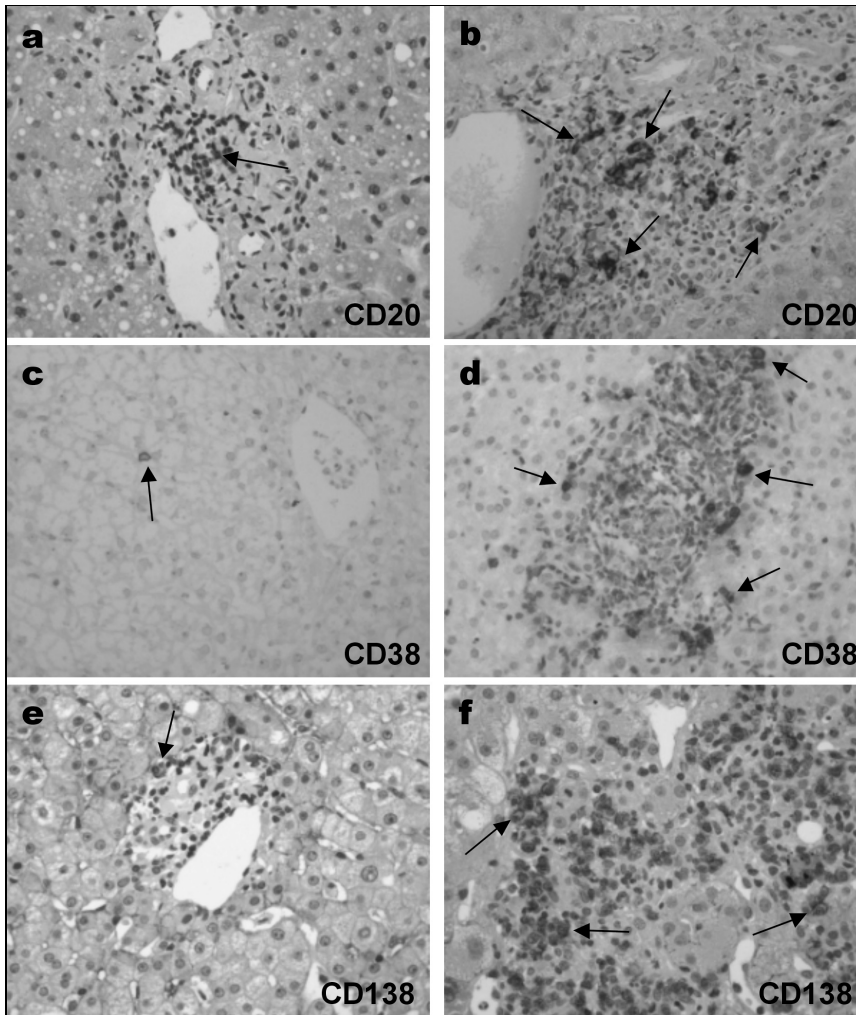


Abb. 2: Vergleich von A0- und VA-Biopsien  
Unterschiedliche Infiltrationsquantität von CD20+ B-Lymphozyten und CD38+/CD138+ Plasmazellen. **a:** A0-Biopsie mit einem CD20+ B-Lymphozyten (Pfeil). **b:** VA-Biopsie desselben Patienten in der akuten Rejektion, Pfeile zeigen auf zum Teil gruppiert liegende CD20+ B-Lymphozyten. **c:** A0-Biopsie, Pfeil weist auf isoliert gelegene CD38+ Plasmazelle. **d:** VA-Biopsie desselben Patienten in der akuten Rejektion, Pfeile zeigen CD38+ Plasmazellen, im Hintergrund schwach CD38+ Lymphozyten. **e:** A0-Biopsie, Pfeil weist auf eine im Portalfeld lokalisierte CD138+ Plasmazelle. **f:** VA-Biopsie desselben Patienten in der akuten Rejektion, Pfeile weisen auf zahlreiche CD138+ Plasmazellen. (Originalvergrößerung a-f 200x).

dem diffus und einzellig verteilt (Abb. 2c, 2e). Auffällig war eine enge Lokalisation der CD38+/CD138+ Plasmazellen zu den kleinkalibrigen Gefäßen und Kapillaren (Abb. 2e). CD38+/CD138+ Plasmazellen in VA-Biopsien: In sämtlichen Fällen waren CD38+/CD138+ Plasmazellen in den Biopsien nachweisbar (Mittelwert: 20,3 Zellen pro Portalfeld, Abb. 1). Diese waren ebenso wie die CD20+ B-Lymphozyten prädominant in den Portalfeldern in kleinen bis mittelgroßen Aggregaten lokalisiert. Die Identifikation von CD138+ Plasmazellen in perisinuidaler und perizentraler Lage war durch die

hohe CD138-Expression von Hepatozyten und Gallengangsepithelien in einzelnen Fällen erschwert, gelang aber doch eindeutig durch die charakteristische Zytologie der Plasmazellen. Das Verteilungsmuster der CD38+ Plasmazellen entsprach weitgehend den CD138+ Plasmazellen, auffällig war jedoch eine unterschiedliche Expressionsintensität von CD38: Es fand sich eine schwache zytoplasmatische CD38-Expression auf kleinen bis mittelgroßen lymphoiden Zellen sowie eine kräftige zytoplasmatische CD38-Positivität in Zellen mit Plasmazellmorphologie (Abb. 2d, 2f).

Quantitativer Unterschied der CD20+ B-Lymphozyten und CD38+/CD138+ Plasmazellen in A0- und VA-Biopsien: Im Vergleich von 12 bzw. 15 Paaren der A0- und VA-Biopsien zeigte sich (bei Auszählung von sämtlichen Zellen in 5 Portalfeldern) für CD20 ein hochsignifikanter Unterschied ( $p = 0,002$ ) und für CD38/CD138 ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,02$ , Abb. 1).

Ki67+/CD20+ B-Lymphozyten in A0- und VA-Biopsien: Ki67+/CD20+ B-Lymphozyten waren nur ganz vereinzelt in den A0- und vereinzelt in den VA-Biopsien nachweisbar (Mittelwert: 0,1 Zellen bzw. 0,8 Zellen pro Portalfeld, Abb. 3a, 3b). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Quantität proliferierender B-Lymphozyten in der A0- und VA-Biopsie konnte nicht nachgewiesen werden ( $p = 0,2$ , Abb. 4). MIP-3 $\alpha$ - und CCR-6-Expression in VA-Biopsien: MIP-3 $\alpha$ + Zellen waren ausschließlich in den Portalfeldern lokalisiert. Die MIP-3 $\alpha$ -Expression war nahezu ausschließlich auf segmentkernigen Granulozyten nachweisbar, vereinzelt stellte sich eine MIP-3 $\alpha$ -Expression auf mononukleären Zellen mit Lymphozytenmorphologie dar (Abb. 3c). Hepatozyten, Gallengangsepithelien, von Kupffer'sche Sternzellen und Blutgefäße zeigten keine Reaktivität. CCR-6+ Zellen waren ebenfalls ausschließlich in den Portalfeldern lokalisiert. Hier war die Expression ausschließlich auf mononukleären Zellen nachweisbar (Abb. 3d). Wie auch für MIP-3 $\alpha$  war in den Zellen des hepatischen Parenchyms keine spezifische Expression nachweisbar.

RT-PCR von MIP-3 $\alpha$  und CCR-6: In beiden Fällen von kryoasservierten VA-Biopsien konnte ein spezifisches Amplifikat für MIP-3 $\alpha$  und CCR-6 erbracht werden (Abb. 5). Die Amplifikate fanden sich im erwarteten Größenbereich von 210bp (MIP-3 $\alpha$ ) und 451bp (CCR-6), die Amplifikate wurden durch Sequenzierung validiert (Daten nicht gezeigt).

## Diskussion

### Antikörpervermittelter Mechanismus der Leberreaktion

Obwohl eine enge funktionelle Vernetzung von T- und B-Lymphozyten in immunpathologischen Prozessen be-

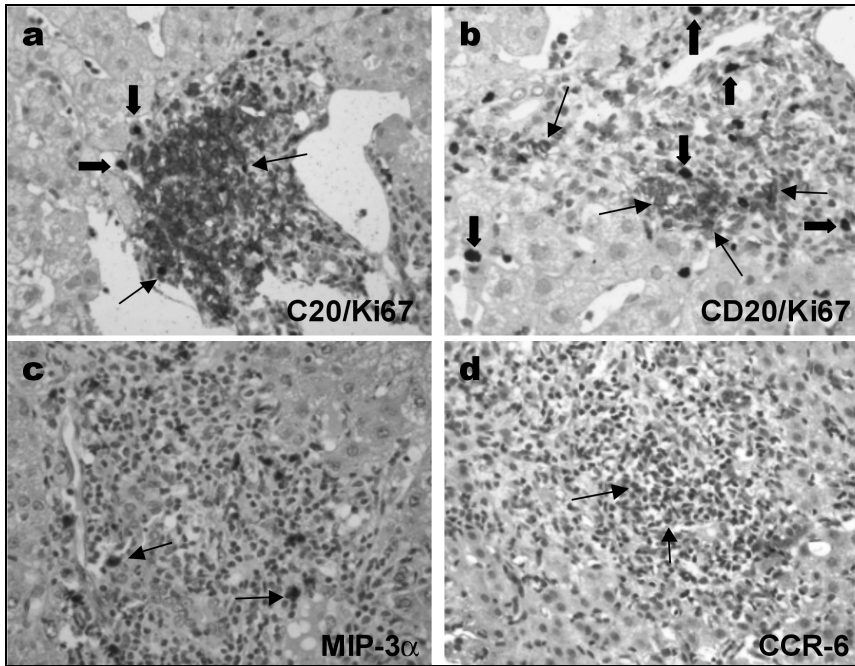


Abb. 3: **a, b:** CD20/Ki67 Doppelfärbung in VA-Biopsien (akute Rejektionen): Die breiten Pfeile zeigen auf Ki67+/CD20- Zellen, schmale Pfeile zeigen auf Ki67-/CD20+ Lymphozyten; beide Aufnahmen dokumentieren, dass die Proliferation (Ki67) nicht mit den CD20+ B-Lymphozyten kolokalisiert ist. **c:** MIP-3 $\alpha$ -Expression in VA-Biopsie (akute Rejektion), Pfeile zeigen auf MIP-3 $\alpha$ + neutrophile Granulozyten. **d:** CCR-6-Expression in VA-Biopsie (akute Rejektion), Pfeile zeigen auf einzelne CCR-6+ mononukleäre Zellen. (Originalvergrößerung a, b 350x, c, d 200x).

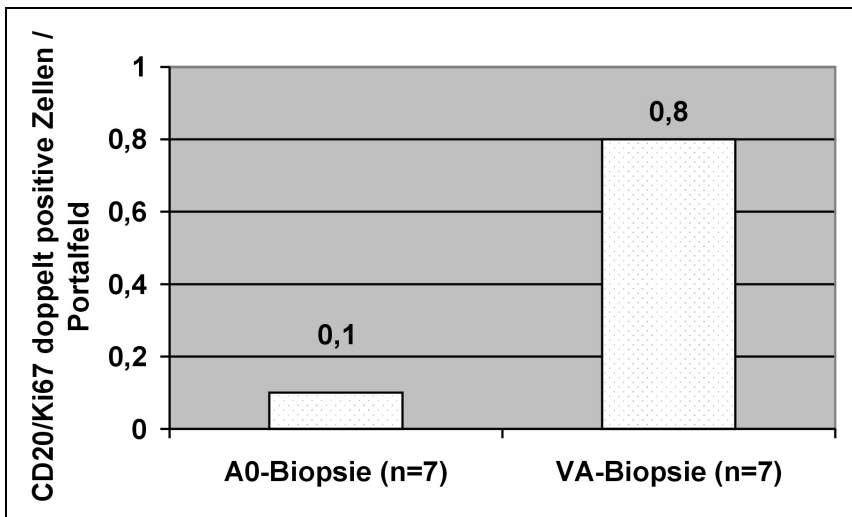


Abb. 4: Anzahl CD20/Ki67 doppelt positiver Zellen pro Portalfeld zum Zeitpunkt der Transplantation (A0-Biopsie) und in der akuten Rejektion (VA-Biopsie). Es gibt keine signifikante Erhöhung des Infiltrats proliferierender B-Lymphozyten zum Zeitpunkt der Rejektion ( $t$ -Test für verbundene Stichproben  $p=0,262$ ).

steht, wurde antikörpervermittelten Mechanismen in der Pathogenese der Leberreaktion keine Bedeutung zugesprochen. Dies ist teils dadurch erklärbar, dass das portale entzündliche Infiltrat der akuten Leberreaktion prädomi-

nant aus T-Lymphozyten besteht (13), und teils durch die Tatsache, dass B-Lymphozyten erst in den letzten Jahren als pathogenetisch relevante Zellen in immunologischen Erkrankungen akzeptiert worden sind (12). Daher existiert

sehr wenige Daten über B-Lymphozyten (5); einzelne Fallbeschreibungen, welche die Bedeutung von antikörpervermittelten Rejektionsmechanismen in der Leberreaktion hervorheben (17), sowie eine experimentelle Untersuchung an Ratten, welche eine Vermehrung IgG 1 exprimierender Plasmazellen in der akuten Leberreaktion beschreibt (16): In dieser experimentellen Untersuchung wird erstmals beschrieben, dass sich die signifikante Veränderung nicht in der T-Zell-Zytokinantwort, sondern in der B-Zell-Antwort ereignet.

#### Nachweis intrahepatischer B-Lymphozyten und Plasmazellen in der akuten Rejektion

Zur Histopathologie der B-Lymphozyten und deren Differenzierungsendprodukten, den Plasmazellen, sowie zur Frage der Expression B-Zell-spezifischer Chemokine in der akuten humanen Leberreaktion existieren bisher keine Daten. In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass CD20+ B-Lymphozyten und CD38+/CD138+ Plasmazellen in sämtlichen Biopsien der akuten Rejektion nachweisbar waren und dass eine signifikante Zunahme von B-Lymphozyten und Plasmazellen in der akuten Rejektion erfolgt. Da keine wesentliche Zunahme der CD20-Proliferation nachgewiesen werden konnte und Plasmazellen keine Teilungsfähigkeit aufweisen, ist die Zunahme der B-Lymphozyten und Plasmazellen als Folge einer Immigration zu interpretieren. Dieser Befund ist interessant, da dieser Mechanismus bereits für andere autoimmun bedingte Entzündungen postuliert wurde (12) und experimentell eine Rezirkulationsfähigkeit von Plasmazellen erst kürzlich belegt worden ist (10). Die Immigration von B-Lymphozyten und Plasmazellen in die Portalfelder während der akuten Leberreaktion legt eine pathogenetische Funktion dieser Zellen nahe.

#### MIP-3 $\alpha$ /CCR-6-Expression in der akuten Leberreaktion

Die Immigration von B-Lymphozyten, Plasmazellvorläufern und Plasmazellen in das Portalfeld setzt die Freisetzung von B-Zell-spezifischen Chemokinen voraus. B-Zell-spezifische Chemokine

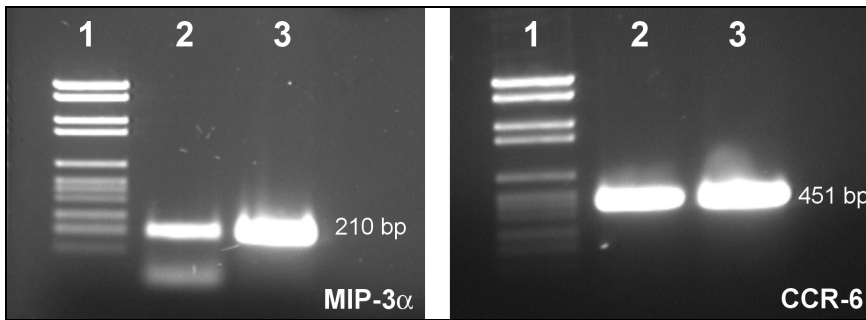


Abb. 5: Mittels RT-PCR konnten MIP-3 $\alpha$  und CCR-6 in jeweils zwei VA-Biopsien nachgewiesen werden. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert. Die Amplifikate fanden sich im erwarteten Größenbereich von 210bp (MIP-3 $\alpha$ ) bzw. 451bp (CCR6). Spur 1 Molekulargewichtsmarker, Spur 2 und 3 VA-Biopsien.

und deren Rezeptoren stellen eine erst kürzlich beschriebene Gruppe von Mediatoren dar (6). B-Zell-spezifische Chemokine wurden erstmalig in lymphatischen Organen und im Knochenmark beschrieben (9), wobei für B-Lymphozyten und Plasmazellen divergente Chemokine zuständig sein dürften und die Regulation der Chemotaxis bevorzugt über das Expressionsniveau der Rezeptoren moduliert wird (10). Das Wirkungsspektrum B-Zell-spezifischer Chemokine ist nicht ausschließlich B-Zell-spezifisch und umfasst auch andere Leukozyten-Populationen (15). MIP-3 $\alpha$  und der entsprechende Rezeptor CCR 6 (8) stellen ein B-Zell-Chemokinsystem dar (11), welches bevorzugt auf B-Gedächtniszellen wirkt (11) und zusätzlich eine aktivierende Wirkung auf eosinophile Granulozyten, T-Lymphozyten und dendritische Zellen ausübt (15). Die MIP-3 $\alpha$ -Expression wurde in Granulozyten (14) in der synovialen Deckzellschicht, in Lymphozyten und dendritischen Zellen nachgewiesen (3), die Expression von CCR-6 in T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen (8). Somit steht der Nachweis von MIP-3 $\alpha$  auf infiltrierenden Granulozyten und einzelnen mononukleären Zellen im Portalfeld und CCR-6 auf infiltrierenden mononukleären Zellen gut in Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen zellulären Expressionsmuster.

#### Pathogenetische Relevanz von intrahepatischen B-Lymphozyten und Plasmazellen

Der Nachweis von MIP-3 $\alpha$ /CCR-6 auf den pathognomonischen Infiltraten der akuten Rejektion legt nahe, dass dieser Mediator/Rezeptor über Rekrutierung von B-Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten an der Pathogenese der akuten Leberrejektion beteiligt ist. MIP-3 $\alpha$  könnte für die Rekrutierung der CD20+ B-Lymphozyten, der CD38+/138+ Plasmazellen sowie der für die Rejektion pathognomonischen eosinophilen Granulozyten verantwortlich sein. Die immigrierten B-Lymphozyten und Plasmazellen könnten durch Antikörperproduktion und Antigenpräsentation den lokalen entzündlichen Prozess perpetuieren. Die lokale MIP-3 $\alpha$ /CCR-6-Expression kann somit als ein pathogenetischer Faktor für Rekrutierung von B-Lymphozyten und Plasmazellen angesehen werden. Zu prüfen wäre, ob erhöhte Serumspiegel von MIP-3 $\alpha$  oder das Auftreten von Plasmazellen im peripheren Blut als ein frühes diagnostisches Indiz für eine akute Leberrejektion zu werten sind. Der Nachweis einer portalen Infiltration durch B-Lymphozyten und Plasmazellen sowie die Expression des B-Zell-spezifischen Chemokins MIP-3 $\alpha$  in der akuten Leberrejektion legt erstmalig einen lokalen, antikörpervermittelten Pathogenesemechanismus der Leberrejektion nahe. Die Abklärung der B-Zell-Spezifität intrahepatischer B-Lymphozyten und Plasmazellen kann zur Identifikation rejektionsauslösender Antigene führen und somit die Möglichkeit neuer diagnostischer und therapeutischer Optionen ergeben.

## Danksagung

Besonderen Dank schulden wir Frau G. Fernahl und Herrn K. H. Friedrich für hervorragende technische Assistenz.

## Literatur

1. Arce E, Jackson DG, Gill MA, Bennett LB, Banchereau J, Pascual V (2001) Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 167: 2361-2369
2. Briscoe DM, Alexander SI, Lichtman AH (1998) Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol* 10: 525-531
3. Chabaud M, Page G, Miossec P (2001) Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol* 167: 6015-6020
4. Demetris A, Adams D, Bellamy C, Blakolmer K, Clouston A, Dhillon AP, Fung J, Gouw A, Gustafsson B, Haga H, Harrison D, Hart J, Hubscher S, Jaffe R, Khettry U, Lassman C, Lewin K, Martinez O, Nakazawa Y, Neil D, Pappo O, Parizhskaya M, Randhawa P, Rasoul-Rockenschaub S, Reinholt F, Reynes M, Robert M, Tsamandas A, Wanless I, Wiesner R, Wernerson A, Wrba F, Wyatt J, Yamabe H (2000) Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. *An International Panel. Hepatology* 31: 792-799
5. Dollinger MM, Howie SE, Plevris JN, Graham AM, Hayes PC, Harrison DJ (1998) Intrahepatic proliferation of 'naive' and 'memory' T cells during liver allograft rejection: primary immune response within the allograft. *FASEB J* 12: 939-947
6. Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M (1996) A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87: 1037-1047
7. Goddard S, Williams A, Morland C, Qin S, Gladue R, Hubscher SG, Adams DH (2001) Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation* 72: 1957-1967
8. Greaves DR, Wang W, Dairaghi DJ, Dieu MC, Saint-Vis B, Franz-Bacon K, Rossi D, Caux C, McClanahan T, Gordon S, Zlotnik A, Schall TJ (1997) CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells. *J Exp Med* 186: 837-844
9. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, Zou YR, Littman DR, Cyster JG (2001) A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 194: 45-56
10. Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hammann A, Radbruch A, Manz RA (2002) Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol* 169: 1277-1282
11. Liao F, Shirakawa AK, Foley JF, Rabin RL, Farber JM (2002) Human B cells become

- highly responsive to macrophage-inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand-20 after cellular activation without changes in CCR6 expression or ligand binding. *J Immunol* 168: 4871-4880
12. Magalhaes R, Stiehl P, Morawietz L, Berek C, Krenn V (2002) Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. *Virchows Arch* 441:4 15-427
  13. McCaughan GW, Davies JS, Waugh JA, Bishop GA, Hall BM, Gallagher ND, Thompson JF, Sheil AG, Painter DM (1990) A quantitative analysis of T lymphocyte populations in human liver allografts undergoing rejection: the use of monoclonal antibodies and double immunolabeling. *Hepatology* 12: 1305-1313
  14. Scapini P, Laudanna C, Pinardi C, Allavena P, Mantovani A, Sozzani S, Cassatella MA (2001) Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol* 31: 1981-1988
  15. Sullivan SK, McGrath DA, Liao F, Boehme SA, Farber JM, Bacon KB (1999) MIP-3alpha induces human eosinophil migration and activation of the mitogen-activated protein kinases (p42/p44 MAPK). *J Leukoc Biol* 66: 674-682
  16. Sun J, McCaughan GW, Matsumoto Y, Sheil AG, Gallagher ND, Bishop GA (1994) Tolerance to rat liver allografts. I. Differences between tolerance and rejection are more marked in the B cell compared with the T cell or cytokine response. *Transplantation* 57: 1349-1357
  17. Takakura K, Kiuchi T, Kasahara M, Inomata Y, Tanaka K (1999) Humoral immunity in acute cellular rejection after living-donor liver transplantation. *Transplant Proc* 31: 526-527
  18. Vella JP, Magee C, Vos L, Womer K, Rennke H, Carpenter CB, Hancock W, Sayegh MH (1999) Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation* 67: 1523-1532