

1. Einleitung

Allogene Nierentransplantation: klinischer Hintergrund

Seit den frühen Anfängen in den 50er und 60er Jahren hat sich die Organtransplantation, als Therapie der Wahl bei chronischen Organversagen, zu einem standardisierten Verfahren in der Medizin entwickelt. Nach der ersten langfristig erfolgreich durchgeführten Nierentransplantation 1954 am Peter Brigham Hospital in Boston ist die Anzahl auch anderer übertragener Organe wie Herz und Leber weltweit bis heute beachtlich gesteigert worden. Ermöglicht wurde dies vor allem durch die Gewebetypisierung, die Immunsuppression und Fortschritte in der chirurgischen Technik, sowie der Beherrschung begleitender infektiologischer Probleme. Das 1-Jahres-Patientenüberleben nach einer Nieren-, Herz- oder Lebertransplantation liegt heutzutage bei etwa 90 bis 95% und das 1-Jahres-Transplantatüberleben zumeist über 85%.

Die Organtransplantation bedeutet bei terminalem Herz- und Leberversagen immer eine lebenserhaltende Maßnahme, und ist, wie bei der Nierentransplantation, mit einer signifikanten Verbesserung der Lebensqualität für den Patienten verbunden. Eindrucksvoll deutlich wird dies am Beispiel des nierentransplantierten Patienten und der damit verbundenen Befreiung von der chronischen Dialysepflicht. Dadurch ergibt sich für die Mehrzahl der Patienten auch eine verbesserte Integration zurück in das Arbeitsleben und die wirtschaftlichen Kosten werden vergleichend zur Dialysepflicht gesenkt (1). Darüber hinaus wird für Patienten nach Nierentransplantation eine verbesserte Prognose hinsichtlich des Langzeitüberlebens insgesamt angenommen (2).

Definition des Hirntodes und dessen Einfluss auf die Qualität peripherer Organe

Der Hirntod im Organspender wurde in Ländern wie Großbritannien als ein Zustand der irreversiblen Schädigung des Hirnstammes, in Ländern wie beispielsweise den Vereinigten Staaten, als Schädigung des gesamten Gehirns, definiert (3). Die Diagnose wird auf der Grundlage definierter neurologischer Kriterien eines irreversiblen Komas, des Nichtvorhandenseins von Hirnstammreflexen und dem Mangel einer Spontanatmung getroffen (3). Die Mehrzahl der Organe für eine Transplantation stammen von hirntoten Spendern. Es gibt heute zunehmend Hinweise dafür, dass beim

hirntoten Spender, anders als bei Organen von lebenden Spendern, wesentliche Veränderungen den Ausgangszustand der zu transplantierenden Organe bereits zu Beginn nach Transplantation beeinflussen. Der Hirntod ist eine einsetzende Störung der Hämostase die durch den Zusammenbruch übergeordneter Steuermechanismen des Zentralnervensystems hervorgerufen wird, bevor die Organe entnommen und transplantiert werden. Dieser verursacht strukturelle und physiologische Störungen des peripheren Gewebes (4-6), die noch während und aggravierend nach der zentralen Schädigung in den zu transplantierenden Organen auftreten können (7). Das bedeutet, dass, trotz optimaler Erhaltung des potentiellen Organspenders, sich erste inflammatorische Veränderungen nicht erst mit der Reperfusion nach der Kaltlagerung, sondern bereits während des Stadiums des Hirntodes und damit vor Organentnahme entwickeln (7). Experimentell geht man davon aus, dass die zentrale Schädigung eine prompte und massive Expression von Histokompatibilitäts-Antigenen, Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und anderer Akut-Phasen-Proteine in Nieren, sowie auch in anderen peripheren Organen hervorruft (6). Sowohl Makrophagen als auch T-Helfer (Th)-Zellen spielen hierbei eine zentrale Rolle. Aber auch Hormone und Entzündungsmediatoren werden freigesetzt, die das Organ direkt schädigen können (8). Als Folge der Entzündung findet unabhängig davon, ob sie durch eine mechanische, immunologische oder infektiöse Schädigung bedingt ist, eine Stimulierung der Akut-Phasen-Adhäsionsmoleküle (Selektine) und Zelloberflächenglykoproteine statt, und es kommt zur frühen Rekrutierung zirkulierender polymorphnuklearer Leukozyten (PMN) am Gefäßendothel (9, 10) und zur nachfolgenden Extravasation an den Entzündungsort. P-Selektin wird aufgrund von Thrombin und Histamin innerhalb weniger Minuten an der Oberfläche des Endothels oder der Blutplättchen exprimiert (11). E-Selektin wird zu einem späteren Zeitpunkt, nach transkriptioneller Induktion seiner Boten-Ribonukleinsäure (mRNA), durch Interleukin-1 (IL-1) und den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ebenfalls an der Oberfläche dargestellt (11). Anschließend kommt es zur Bindung der Liganden (L-Selektin und P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1)) auf der Oberfläche der PMN mit den endothelialen E- und P-Selektinen, welche die Zellen in ihrer Fließgeschwindigkeit verlangsamen und so ein Rollen und Adhärenzen an die Gefäßwand ermöglichen (11). Unter anderem kommt es durch Interleukin-8 (IL-8)-Sekretion der Endothelzellen zu einer Konformationsänderung und Aktivierung der auf

den Leukozytenoberflächen befindlichen Integrinen, die auch als Lymphozytenfunktionsantigen 1 (LFA-1 oder Differenzierungscluster (CD) 11a) sowie Mac-1 (CD11b) bezeichnet werden, und zu einer festen, stationären Adhäsion derer, mit den durch IL-1, IL-4 und TNF stimulierten endothelialen Adhäsionsfaktoren ICAM (Interzelluläres Adhäsionsmolekül) und VCAM (Vascular-Cell-Adhesion-Molecule) (11). Durch die Interaktion des sich an den Verbindungsstellen des Endothels befindlichen Plättchen-Endothelzelladhäsions-Moleküls-1 (PECAM-1, CD31), sowie der erwähnten Leukozytenintegrine LFA-1 und Mac-1, folgt eine Durchwanderung der Leukozyten durch das Endothel, die auch als Diapedese bezeichnet wird (12). Durch lokal hergestellte Chemokine und Zytokine werden die Leukozyten nun aktiviert und lösen eine weitere Kaskade entzündlicher Reaktionen aus (8) (vgl. Abb. 1).

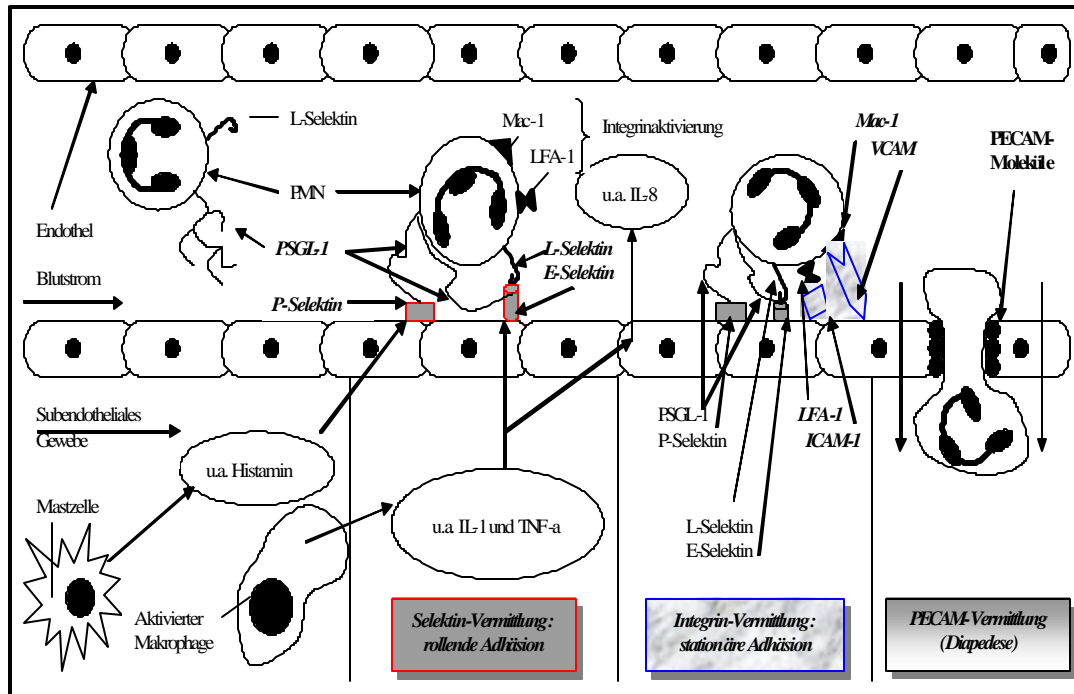


Abb. 1 zeigt die schematische Darstellung der Leukozytenextravasation. P-Selektin (von Histamin der Mastzelle stimuliert) und E-Selektin (von IL-1 und TNF- α aktivierter Makrophagen induziert) werden am Gefäßendothel exprimiert und von L-Selektin bzw. PSGL-1 der Leukozyten gebunden (rollende Adhäsion, Selektin-Vermittlung). Die Integrin-Vermittlung (stationäre Adhäsion) kommt durch die IL-1 und TNF- α stimulierten VCAM- und ICAM-Moleküle des Endothels mit den leukozytären LFA-1- und Mac-1- Rezeptoren (u.a. von IL-8 des Endothels stimuliert) zustande. Durch das endotheliale PECAM-Molekül kommt es schließlich zur Diapedese (=Leukozytentransmigration), das heißt zu einer Wanderung der Leukozyten durch das Gefäßendothel. PMN, polymorphkernige Leukozyten; Selektin, Akut-Phasen-Adhäsionsmolekül; IL, Interleukin; TNF- α , Tumornekrosefaktor alpha; VCAM, Vascular-Cell-Adhesion-Molecule; ICAM, Interzelluläres Adhäsionsmolekül; PSGL-1, P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1; PECAM-1, Plättchen-Endothelzelladhäsions-Molekül-1; Mac-1, Leukozytenintegrin; LFA-1, Lymphozytenfunktionsantigen-1.

Da die Leukozytenextravasation einen wichtigen Teil letztlich eines jeden Entzündungsprozesses darstellt, ist es entscheidend, diesen Vorgang bei Transplantationen zu beeinflussen. Eine Möglichkeit besteht darin die Funktion bestimmter Adhäsionsmoleküle beispielsweise mit spezifischen Substanzen zu blockieren (13, 14). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine rekombinante Form von P-Selektin-Glykoprotein-Ligand (rPSGL-Ig) verwendet, um die initiale Aktivierung von Selektinen vor und nach der Revaskularisation in Nierenallotransplantaten hirntoter Spender zu hemmen (8).

Chronische Abstoßung: das klinische Problem

Die akute Abstoßung war noch in den 80er Jahren einer der bedeutendsten Faktoren für einen Transplantatverlust innerhalb des ersten Jahres nach der Nierentransplantation (15). Daher galt es, gerade dieses Ereignis weitgehend zu beherrschen. Eine entscheidende Ursache für ein limitiertes Langzeit-Transplantatüberleben stellt heute eine klinisch-pathologische Einheit, die chronische Abstoßung, dar. Kennzeichen einer chronischen Transplantatabstoßung ist vor allem eine über Monate und Jahre langsam, kaum aufzuhaltende Funktionsverschlechterung des Transplantates (15). Die chronische Abstoßung kann bei allen Organtransplantationen, das heißt der Lunge, des Herzens, des Pankreas, der Niere und in geringem Ausmaß der Leber entstehen (16-18). Für die Nierentransplantation zeigt sich die chronische Transplantatdysfunktion mittlerweile als eine der häufigsten Ursachen terminalen Nierenversagens, langfristig mit gegenwärtig etwa 25 bis 30% betroffener Patienten, die nach Rückkehr zur Dialyse auf ein neues Transplantat warten (19). Die Zahl der Menschen, die vor diesem Hintergrund auf ein geeignetes Transplantat wartet, steigt damit weiter an, so dass die Diskrepanz zwischen vorhandenen Spenderorganen und Organbedarf immer größer wird (19). Auch durch eine effektivere Immunsuppression, bessere Techniken im Bereich der Organkonservierung und Fortschritte im perioperativen Management, konnten bislang die langfristigen Überlebensraten solider Allotransplantate nur wenig verbessert werden (7). Da vor diesem Hintergrund immer häufiger Transplantate potentiell verringerter Qualität akzeptiert werden, um den wachsenden Organmangel zu reduzieren, ist es offensichtlich, dass eine Vielfalt der mit dem Spender assoziierten Risikofaktoren das kurz- und langfristige Überleben des Transplantates ungünstig beeinflusst (7).

Bislang ist die chronische Abstoßung ein im wesentlichen unverstandener immunologischer Prozess, der morphologisch zum schleichendem Verlust funktionsfähiger Nephrone und einer interstitiellen Fibrose im Transplantat führt (15). Funktionell ist dieses Funktionsdefizit häufig mit hypertensiven Problemen vergesellschaftet. Trotz umfassender Forschung bleiben die genauen Mechanismen, die bei der chronischen Abstoßung festgestellten charakteristischen pathologischen Veränderungen verantwortlich sind, weiterhin unklar (15). Es scheint jedoch, dass sämtliche Einflüsse, die das Endothel der Transplantatgefäße schädigen, den Vorgang der chronischen Abstoßung beschleunigen (20).

Für die Induktion chronischer Abstoßung nach der Nierentransplantation werden sowohl Alloantigen-abhängige Faktoren wie der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) beim Menschen (HLA-Match), die akute Abstoßung und die chronische Empfänger-Allo-Immunreaktivität, als auch Alloantigen-unabhängige Faktoren, wie Spenderalter, Geschlecht, Spenderhirntod, Ischämie/Reperfusion (I/R), Nephrotoxizität, Infektion mit dem Zytomegalie-Virus (CMV) und die funktionelle übertragende Nierenmasse verantwortlich gemacht. Das bedeutet, dass eine chronische Abstoßung nicht nur immunogene, das heißt Alloantigen-abhängige Faktoren eine chronische Immunantwort im Empfänger auslösen können, sondern auch nicht-immunogene oder alloantigen-unabhängige Faktoren diese hervorrufen können. Letztere können also an der Induktion einer Abstoßungsreaktion des Transplantates nicht nur mitwirken, sondern diese unter Umständen sogar maßgeblich auslösen (15). An der chronischen Transplantatabstoßung können nach derzeitigen Erkenntnissen aus experimentellen Modellen alle zellularen und humoralen Elemente des Immunsystems beteiligt sein. Die spezifische Antigenerkennung als zentrales Ereignis der zellulären Immunantwort bei der Transplantatabstoßung beruht auf der Interaktion von Antigen präsentierenden Zellen (APC) (B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) und T-Lymphozyten, und der daraus resultierenden Aktivierung von T-Zellen. Die dabei kommunizierenden Zellen, T-Zellen und APC, richten sich daher nur danach, ob das Antigen, als Komplex aus Peptid und MHC-Molekül, exogener oder endogener Herkunft ist. Beide werden jedoch als Komplex aus Peptid und MHC-Molekülen erkannt. Exogene Antigene werden typischerweise zusammen mit MHC Klasse II-Molekülen auf APC von CD4⁺ T-Zellen erkannt, während hingegen endogene Antigene

zusammen mit MHC Klasse I-Molekülen auf APC mit CD8⁺ T-Zellen interagieren. Das genaue Verständnis der T-Zellaktivierung ist unabdingbar für die therapeutische Behandlung transplantierter Patienten. Dieser immunologische Mechanismus ist Ausgangspunkt der Medikation, auf die später noch eingegangen wird. Daher ist es entscheidend, diesen Vorgang genauer zu eruieren. Ob eine T-Zelle proliferiert und zur T-Effektorzelle wird, hängt von der Interleukin-2 (IL-2) Produktion ab (21). Daher ist die wichtigste Funktion des costimulatorischen Signals, diese Produktion zu unterstützen (22). Anhand dessen sei nun die T-Zellaktivierung beschrieben.

Nachdem der T-Zellrezeptor an den Haupthistokompatibilitäts (MHC)-Komplex gebunden hat, als Signal 1 bezeichnet, erfordert es einer Costimulation, das so genannte Signal 2, das unter anderem Tyrosinkinasen (ZAP-70, Fyn) innerhalb der T-Zelle aktiviert (23, 24). Daraufhin wird einer der entscheidenden Signalwege, der Calcium-Calcineurin-Pfad, eingeleitet. Die nun durch die Phospholipase C (PLC) und Inositoltriphosphat (IP₃) aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzten Calcium-Ionen (Ca²⁺) bewirken eine Aktivierung des Calmodulins, das seinerseits das entscheidende Enzym Calcineurin aktiviert (25). Calcineurin ist zum einen verantwortlich für die Dephosphorylierung und damit der Translokation des Kernfaktors NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) in den Nucleolus, als auch für die des Kernfaktors c-Jun in den Zellkern (25, 26). Ein dritter Kernfaktor NF- κ B wird durch die Diacylglycerol (DAG)-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) ebenfalls dephosphoryliert und damit aktiviert. Die wichtigste Auswirkung der costimulatorischen Bindung des Moleküls B7 auf der T-Zelle mit CD 28 auf APC liegt jedoch in der Stabilisierung der IL-2 mRNA (22, 25, 26). Dieser Effekt resultiert schließlich in einer 20 bis 30-fach gesteigerten Produktion von IL-2 (22, 25, 26) (vgl. Abb. 2).

Im weiteren Verlauf der nach Antigenerkennung von Makrophagen und T-Zellen gebildeten und ausgeschütteten Zytokine und Chemokine, können offensichtlich sowohl Komponenten der angeborenen Immunität, als auch weitere, spezifische Mechanismen der Antikörperbildung, sowie die durch CD8⁺ T-Zellen vermittelte Zytotoxizität, mit von großer Bedeutung bei der entstehenden Immunantwort sein (27, 28).

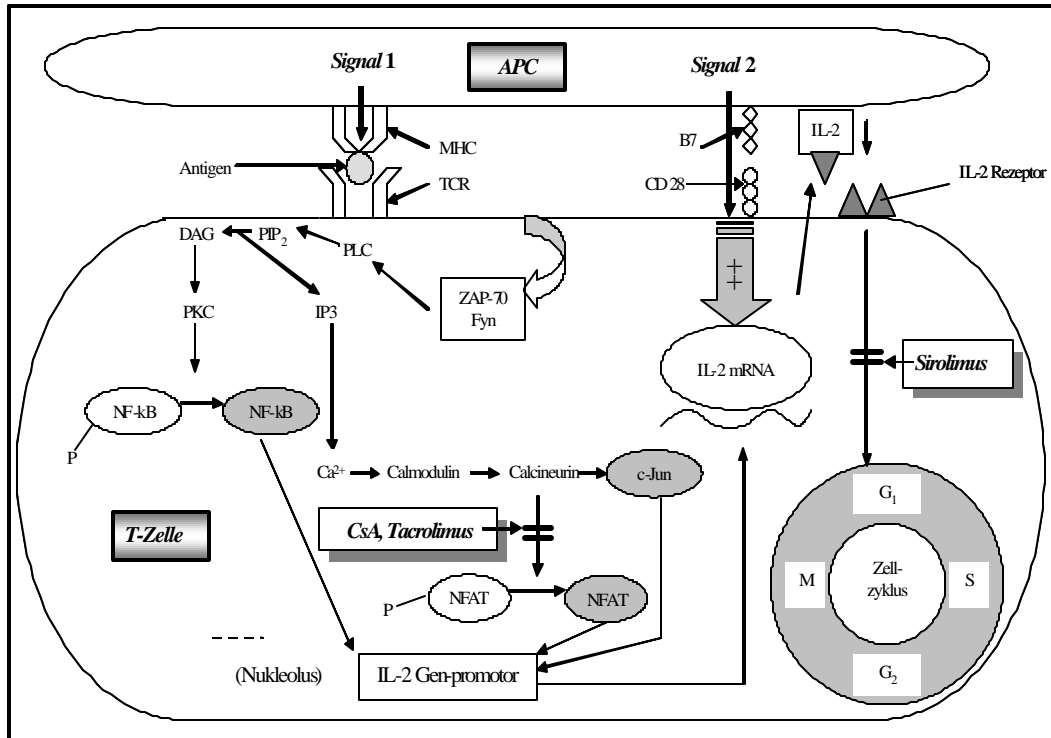


Abb. 2 gibt einen Überblick über die biochemischen Signale, die für eine T-Zellaktivierung erforderlich sind und zeigt Angriffspunkte einiger auserwählter Immunsuppressiva, die u.a. im Rahmen dieser Arbeit verwendet worden sind. Durch Signal 1 (MHC Klasse II-TCR-Bindung) und Signal 2 (z.B. B7-CD28-Bindung) kommt es u.a. zur Aktivierung der Tyrosinkinasen ZAP-70 und Fyn, die über zwei verschiedene Signalwege (IP₃ und DAG) die Translokation von Kernfaktoren (NF-κB, NFAT, c-Jun) veranlassen, die für eine IL-2-Produktion mitverantwortlich sind. Durch das costimulatorische Signal (Signal 2) kommt es zu einer Stabilisierung der IL-2-mRNA und damit zu einer etwa 20-30fach gesteigerten Produktion von IL-2. CsA und Tacrolimus hemmen die intrazelluläre Signalübertragung indem sie das Enzym Calcineurin hemmen, Sirolimus hingegen verhindert die Differenzierung und Proliferation von Th-Zellen in der G-Phase des Zellzyklus durch Blockierung des IL-2-Rezeptors. IL-2, Interleukin-2; Ca²⁺, Calcium-Ionen; IP₃, Inositol 1,4,5-triphosphat; DAG, Diacylglycerol; PIP₂, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat; PLC, Phospholipase C; NF-κB, NFAT, c-Jun bezeichnen Kernfaktoren; PK C, Proteinkinase C; TCR, T-Zellrezeptor; MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex; G₁-, S-, G₂-, M-Phasen bezeichnen Abschnitte des Zellzyklus; mRNA, Boten-Ribonukleinsäure; +, Stabilisierung; -, Hemmung; APC, Antigen präsentierende Zelle.

Problematisch stellt sich außer den erwähnten Faktoren die eine Abstoßung des Organs induzieren können, die nach Organtransplantation im Empfänger relativ unspezifisch durchgeführte Immunsuppression im klinischen Alltag dar. Teilweise sind die Immunsuppressiva mit zahlreichen Nebenwirkungen auf einzelne Organsysteme oder Stoffwechselprozesse verbunden. Die Interaktion einzelner Medikamente stellen zusätzlich zu lösende Probleme in der täglichen Routine transplantierter Patienten dar (29, 30).

Folgende Abbildung zeigt nochmals zusammenfassend die Mechanismen die eine chronische Transplantatabstoßung induzieren können, sowie deren Zusammenspiel (vgl. Abb. 3).

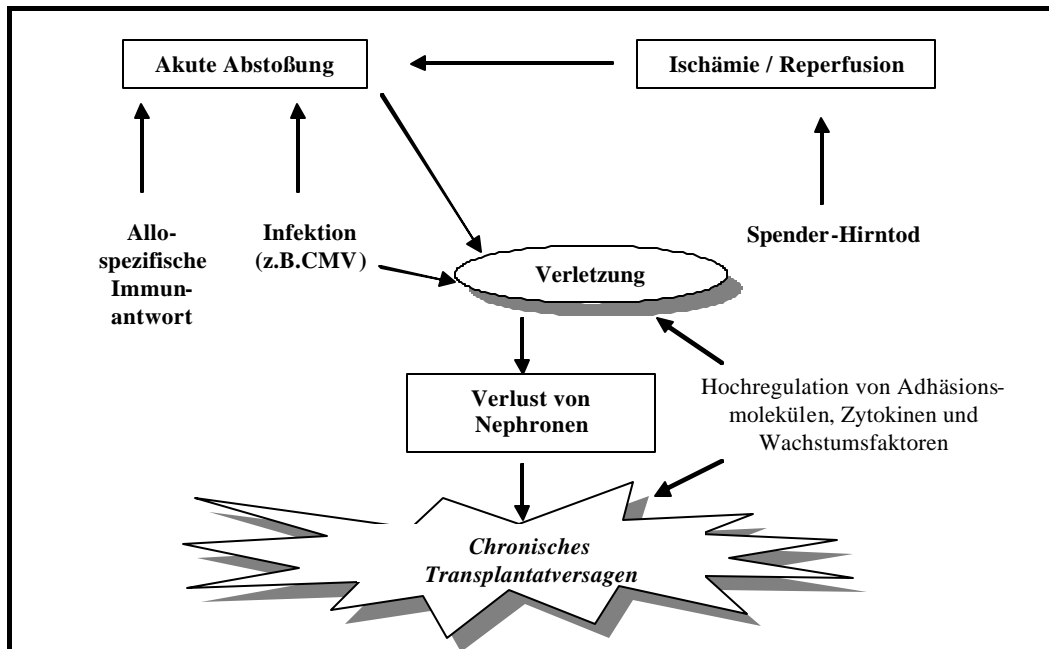


Abb. 3 veranschaulicht das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die für ein chronisches Transplantatversagen verantwortlich sein können. CMV, Zytomegalie-Virus.

Klinische Immunsuppression

Generell erfordern allogene Transplantationen zur Unterdrückung der gegen das Transplantat gerichteten Immunantwort eine medikamentöse Immunsuppression. Immunologische Reaktionen können prinzipiell durch unspezifische, allgemeine, wie spezifische Immunsuppressiva supprimiert werden (29-31). Die allgemeine Immunsuppression hat den Nachteil, unspezifisch auf den Empfänger zu wirken, das heißt, sie greift auch Zellen an, die dem Immunsystem nicht angehören, wie beispielsweise die blutbildenden Zellen des Knochenmarks (32, 33). Nicht nur, dass sich daraus lebensbedrohliche Komplikationen ergeben können, die Gefahr für den Empfänger durch Infektionen, zum Beispiel mit dem CMV zu erkranken, und damit das Risiko sein Transplantat zu verlieren, erhöht sich in jedem Fall (15). Ideal wäre die Behandlung mit spezifischen Immunsuppressiva, wie beispielsweise einem monoklonalen Antikörper (mAK), der nur die Immunantwort gegen das Transplantat verhindert. Obwohl dieses Ziel beim Menschen bisher noch nicht verwirklicht werden konnte, sind in Tiermodellen schon viel versprechende Ergebnisse erzielt worden (34). So wurde beispielsweise nach Behandlung mit einem Antikörper (AK) gegen den CD4 Rezeptor von Th-Zellen eine langfristige Transplantatakzeptanz beobachtet (14, 35-37).

Nach neuesten Erkenntnissen befindet sich ein mAK gegen den von Th-Zellen exprimierten Oberflächenrezeptor CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CD 152) in klinischer Erprobung (38). Bei Organtransplantationen spielt heutzutage noch die unspezifische Immunsuppression die entscheidende Rolle.

Nichtspezifische Immunsuppression

Die heutzutage verwendeten Immunsuppressiva lassen sich in die drei Kategorien einteilen,

- ◆ der Pilz- und Bakterienwirkstoffe (Cyclosporin A; Tacrolimus und Sirolimus),
- ◆ der entzündungshemmenden Medikamente (Prednison) und
- ◆ der zytotoxischen Mittel (Azathioprin und Cyclophosphamid) (31).

Um die Akzeptanz eines Transplantates und damit die akute Abstoßung innerhalb der ersten drei Monate zu verhindern, sind nach wie vor Calcineurin-Inhibitoren, wie Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK 506), das Mittel der Wahl (39-42). Beiden, sowohl Cyclosporin A, ein Metabolit des Pilzes *Tolypocladium inflatum* Gams, als auch Tacrolimus, eine Makrolidverbindung aus dem Bakterium *Streptomyces tsukubaensis*, ist eine Hemmung der Produktion von IL-2 und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-3, IL-4, Interferon (IFN)-gamma, Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha, und damit auch eine verminderte T-Zellproliferation gemeinsam (25, 43, 44). Beide Immunsuppressiva entfalten ihre pharmakologische Wirkung durch Bindung an intrazelluläre Proteine, der so genannten Immunophilinen (45-47). Im Falle von Cyclosporin A wären dies die Cyclophilinen, bei Tacrolimus die der FK-bindenden Proteine (39-42). Dieser Komplex aus Immunophilin und Medikament bindet an das von Calmodulin aktivierte Enzym Calcineurin und hemmt dieses. Calmodulin seinerseits wurde, wie schon erwähnt, aus intrazellulär freigesetzten Calcium-Ionen des endoplasmatischen Retikulums aktiviert (25) (vgl. Abb. 2). Wenn die Phosphatase Calcineurin aktiv wäre, würde daraufhin der zytoplasmatische Transkriptionsfaktor NF-ATc dephosphoryliert, in den Zellkern wandern und unter anderem die Transkription der IL-2 Gene induzieren (48). Da sowohl Cyclosporin A, als auch Tacrolimus, ihre Wirkung auf ruhende, nicht aktivierte Zellen entfalten, könnte der Behandlung ein Calcineurin-freier Inhibitor, wie Sirolimus auch Rapamycin genannt, hinzugesetzt werden (30, 31, 49).

Sirolimus (Rapamycin) wird aus dem von der Osterinsel („Rapa ui“ auf Polynesisch, daher der Name der Substanz) vorkommenden Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. Es bindet wie Tacrolimus an Immunophile der sog. FKBP-Gruppe innerhalb der T-Zellen (50-52). Jedoch hemmt dieses nicht die Calcineurinaktivität, sondern es wird durch diesen Immunophilin-Rapamycin-Komplex der IL-2-Rezeptor blockiert. Damit wird die Differenzierung und Proliferation von aktivierten Th-Zellen (in der G1-Phase des Zellzyklus) verhindert (50, 53) (vgl. Abb. 2). Aufgrund der vielfältigen Nebenwirkungen unspezifischer Immunsuppression ist man bestrebt, diese weitgehend zu vermeiden, beziehungsweise ganz auszuschalten.

Spezifische Immunsuppression

Im Gegensatz dazu bietet der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAK) eine spezifischere und gezieltere Immunsuppression. Immunsuppressive Antikörper entfalten ihre Wirkung auf zwei unterschiedlichen Wegen: (1) Die so genannten eliminierenden mAK sind in der Lage Lymphozyten zu zerstören, (2) die nicht eliminierenden mAK blockieren nur den Oberflächenrezeptor (14, 35-38).

rPSGL-Ig

Das Zelloberflächen-Glykoprotein P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) befindet sich auf der Oberfläche praktisch aller Leukozyten. Durch Bindung an P- und E-Selektine, die zur Gruppe früh exprimierter Integrine gehören, adhären Leukozyten an die Gefäßendothelzellen (11, 54-56).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung eines rekombinanten, löslichen P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 Moleküls, das mit humanem IgG1 (rPSGL-Ig) (Genetics Institute / Wyeth Research, Cambridge, MA) fusioniert war in einem Nierentransplantationsmodell überprüft. Dieses Immunglobulin bindet kompetitiv an P-Selektin auf Thrombozyten und aktivierten Gefäßendothelzellen, blockiert damit die Bindung des Oberflächenrezeptor PSGL-1 und unterdrückt so die Immunantwort. rPSGL-Ig ist ein Peptid das aus den ersten extrazellulären 47 Aminosäuren (AS) des humanen PSGL-1 besteht und mit humanem IgG1_{F_C} fusioniert ist (57). Zwei AS an den Positionen 234 und 237 innerhalb des IgG1 F_C-Anteils sind zu Alanin verändert, um sowohl die Komplementaktivierung, als auch die Bindung des F_C-Rezeptors zu

reduzieren (58). Das rPSGL-Ig Molekül besitzt in Ratten eine Halbwertszeit von etwa 100 Std. und wird als Disulfid-gebundenes Dimer ausgeschieden (59).

Costimulatorische Signalwege

T-Helfer (Th)-Zellaktivierung

Das zentrale Ereignis einer zellulären und humoralen Immunantwort ist die Aktivierung und Vermehrung von T-Helfer (Th)-Zellen (60, 61). Ein Lymphozyt benötigt zwei verschiedene Signale, damit er voll aktiviert wird (60). Die Interaktion des T-Zellrezeptor (TCR)-CD-3-Komplexes mit dem MHC Klasse II-Molekül der Antigenpräsentierenden Zelle (APC) bildet das anfängliche Signal (Signal 1), an dessen Ende eine IL-2 Produktion der Th-Zelle steht, die wiederum andere Th-Zellen zur Proliferation anregt (61, 62) (vgl. Abb. 2). Jedoch erfordert eine vollständige Aktivierung der Th-Zellen und damit eine IL-2 Produktion ein so genanntes costimulatorisches Signal (Signal 2) seitens der APC (60, 62) (vgl. Abb. 4). Heute besteht ein großes Interesse dieses 2. Signal besser zu verstehen, da die Kontrolle bzw. das Verständnis für costimulatorische Signale für die Aktivierung des Immunsystems (Lymphozytenaktivierung) von fundamentaler Bedeutung ist. So spielt es auch eine zentrale Rolle bei Organabstoßungen. Die Interaktion der B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) Rezeptoren auf den APC und CD28 beziehungsweise CTLA-4 (CD152) Oberflächenmolekülen auf den Th-Zellen, erzeugen einer der wenig bekannten costimulatorischen Signale. Vor kurzen wurden verschiedene neue Mitglieder der B7 und CD28 Superfamilien der immunen costimulatorischen Moleküle hinzugefügt (63-67). Die ursprünglichen Mitglieder bestehen aus B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD28 und CTLA-4 (CD152) (63-67). B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) sind beide Typ 1 Proteine, die Mitglieder der Immunglobulin (Ig) Superfamilie sind (68, 69). B7-1 wird auf aktivierten B-Zellen, aktivierten T-Zellen und Makrophagen exprimiert (68). B7-2 wird konstitutiv auf ineinander verflochtenen dendritischen Zellen (DC), Langerhans-Zellen, im peripheren Blut, auf dendritischen Zellen, B-Gedächtnis-Zellen und germinalen B-Zellen exprimiert (68, 69). Außerdem wird B7-2 in geringer Ausprägung auf Monozyten exprimiert und durch Interferon (IFN)- γ Stimulierung angeregt. Sowohl B7-1, als auch B7-2 sind in der Lage, die Rezeptoren CD28 und CTLA-4 zu binden (63-68, 70, 71). Es hat sich gezeigt, dass eine Bindung an CTLA-4 eine 20-100fache Erhöhung

der Affinität gegenüber einer Bindung an CD28 aufweist (72). CD28 spielt eine Rolle bei der Aktivierung, während CTLA-4 als inhibitorischer Rezeptor für die Herunterregulierung der Immunantwort von Bedeutung ist (63, 65, 66, 70, 73, 74). Obwohl B7-2 aufgrund seiner konstitutiven Expression auf zahlreichen APC normalerweise als erstes B7 Molekül gefunden wird, scheint es keine signifikanten Unterschiede in den Funktionen von B7-1 und B7-2 zu geben. Von Bedeutung sind eher der gefundene Typ von APC und sein Aktivierungsstatus (63).

CD28 und CTLA-4 (CD152) sind ebenfalls Mitglieder der Immunglobulin (Ig) Familie. CD28 wird auf fast allen CD4⁺ T-Zellen und ungefähr der Hälfte der CD8⁺ T-Zellen exprimiert. CTLA-4 wird nicht konstitutiv exprimiert, sondern wird erst nach Bindung von CD28 und der T-Zellaktivierung stimuliert (75, 76). Die Expression von CTLA-4 auf der Zelloberfläche erreicht ungefähr 48 Std. nach der Aktivierung ihren Höhepunkt. Nach der Bindung des T-Zellrezeptors liefert die Bindung von B7 mit CD28 ein bedeutendes costimulatorisches Signal. Ohne das CD28 Signal würde die T-Zelle apoptotisch werden, das heißt diese aktiviert ein internes Zerstörungsprogramm. Sie kann aber auch in einen anergen Zustand übergehen, das eine fehlende Reaktivität auf Antigene kennzeichnet (63, 65, 66, 77, 78). Die CD28 Bindung kann den Schwellenwert der für die Aktivierung notwendigen TCR Bindung verändern, die für die Stimulierung naiver Zellen notwendige Zeit reduzieren und den Umfang der T-Zellantwort verstärken (63, 65, 79). Nach der CD28 Bindung wird die Zelloberflächenexpression herunterreguliert. Obwohl die Signalwege, die nach der Bindung von CD28 aktiviert werden, umfassend erforscht wurden, ist der eigentliche Mechanismus, durch den das CD28 Signal die Zellaktivierung beeinträchtigt, noch nicht vollkommen geklärt (63, 65). Die Beobachtung, dass in CD28 defizienten Mäusen T-Zellen suboptimal aktiviert werden, lässt die Anwesenheit zusätzlicher costimulatorischer Rezeptoren vermuten (63). CD28 beeinflusst möglicherweise auch die Differenzierung von T-Helfer-Zellen (65). Im Gegensatz zu den stimulatorischen Effekten der CD28 Bindung agiert CTLA-4 als ein inhibitorischer Rezeptor, der für die Herunterregulierung der Immunantwort unerlässlich ist (63, 65, 75, 78, 80). CTLA-4 bindet sowohl B7-1 als auch B7-2 mit einer wesentlich höheren Affinität als CD28. Eine CTLA-4 vermittelte Inhibition resultiert in einer Herunterregulierung der Zytokinproduktion, einer verringerten IL-2 Rezeptorexpression und in einem Stillstand

des Zellzyklus (63, 65, 75, 78, 80). Es scheint, als ob der Mechanismus nicht nur ein intrazelluläres Signal involviert, eine B7 Bindung an CTLA-4 scheint auch eine B7 Bindung an CD28 zu reduzieren. Die kritische Rolle von CTLA-4 bei der Herunterregulierung der Immunantwort wird an CTLA-4 defizienten Mäusen aufgezeigt, die im Alter von 3-5 Wochen als Ergebnis einer lymphoproliferativen Erkrankung sterben (81, 82). Jüngere Forschungen lassen darauf schließen, dass CTLA-4 eine Rolle bei der T-Zelltoleranz spielen könnte (65) (vgl. Abb. 4).

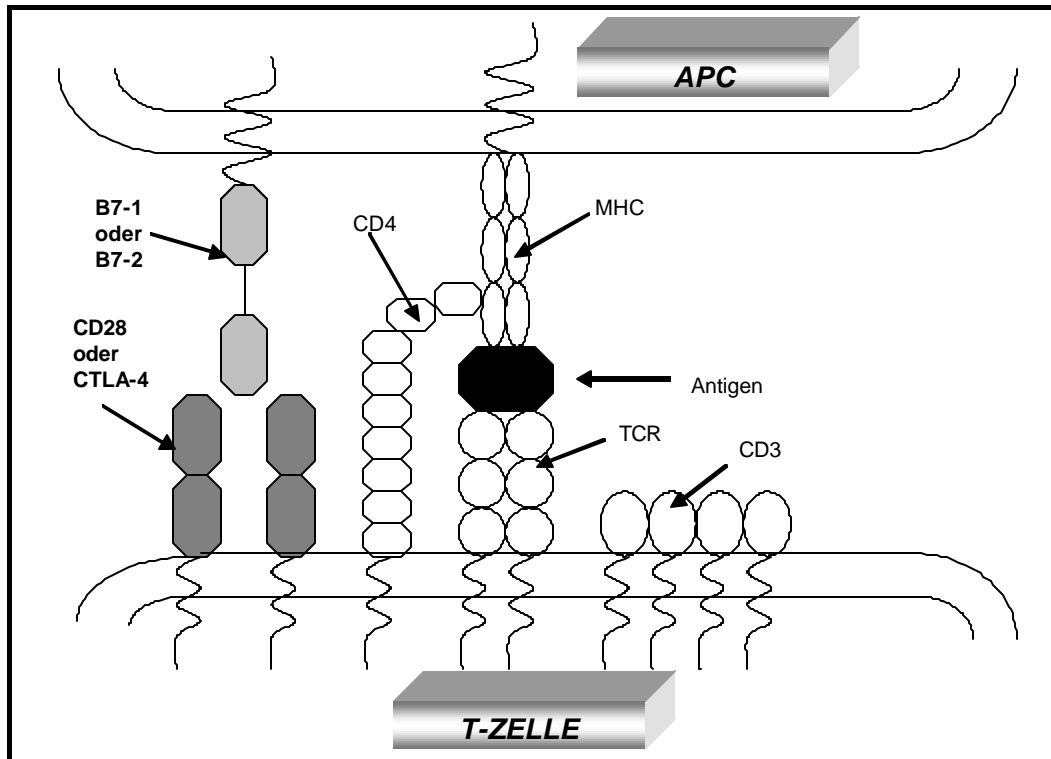


Abb. 4 Schematische Darstellung der Lymphozytenaktivierung. Das 1. Signal wird gebildet von TCR- und CD3-Rezeptor seitens der T-Zelle und des MHC Klasse II-Komplexes der APC. Das 2. (costimulatorische) Signal besteht aus B7-1- und B7-2-Oberflächenrezeptoren der APC und CD 28- und CTLA-4-Molekülen der T-Zelle. TCR, T-Zellrezeptor; CD, Differenzierungscluster; MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex; APC, Antigen präsentierende Zelle; CTLA-4, cytotoxic T-lymphozyte-associated protein 4.

Zusammenfassend stellt die chronische Transplantatabstoßung ein großes Problem nach einer klinischen Nierentransplantation dar und ist mitverantwortlich für ein eingeschränktes Langzeit-Transplantatüberleben (15). Der Spender-Hirntod führt als ein bedeutender Risikofaktor zu inflammatorischen Prozessen mit hoch regulierter Zytokin-Genexpression in peripheren Organen des Spenders vor Organentnahme. Er führt experimentell zu beschleunigter akuter Abstoßung allogener Nierentransplantate in unbeeinflussten Empfängern, beeinträchtigt im Langzeitverlauf die

Transplantatfunktion und ist mit einer beschleunigten morphologischen Zerstörung assoziiert (8).

In dieser Arbeit wird der inhibierende Effekt von rekombinantem P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 Immunglobulin (rPSGL-Ig) auf die initiale Endothelzell-Adhäsion mononuklearer Zellen und damit die inflammatorische Antwort untersucht (rPSGL-Ig-Versuch, vgl. Punkt 3.3.1.). Ferner wird dessen Einfluss auf die chronische Transplantatabstoßung in Verbindung mit einer niedrig bzw. hoch dosierten Kombination aus Sirolimus plus Cyclosporin A (CsA) nach allogener Nierentransplantation aus hirntoten Spendern sowie Lebendspendern untersucht (Sirolimus-Versuch, vgl. Punkt 3.3.2). Beide Versuchsaufbauten werden an einem etablierten chronischen Abstoßungsmodell in der Ratte (F344? LEW) durchgeführt.

Ziel ist es, die Organqualität bei der Leichennierenspende durch Reduzierung der bereits im Spender auftretenden und durch Ischämie / Reperfusion gesteigerten unspezifischen Organschädigung zu verbessern.

2. Fragestellung

Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Veränderungen ruft der Hirntod in den zu transplantierenden Nieren aus Spendern nach Kurzzeitbeobachtung hervor?
2. Welche Rolle spielt der Hirntod als spenderspezifischer Faktor für das langfristige Transplantatüberleben nach allogener Nierentransplantation?
3. Wie können die Auswirkungen des Hirntodes therapeutisch beeinflusst werden?
Ist ein klinischer Einsatz dieser neuen therapeutischen Strategien denkbar?
4. Kann durch Kombination aus niedrig dosiertem Cyclosporin A (CsA) und einem nicht-Calcineurin-Inhibitor, wie Sirolimus zur Reduktion der CsA bedingten Toxizität, ein langfristiges Überleben des Nierentransplantates erzielt werden?
Welche Auswirkungen zeigen sich aus funktioneller Sicht?
5. Können neue therapeutische Ansätze zur Beeinflussung des unspezifisch schädigenden Spenderfaktors Hirntod mit gegenwärtigen immunsuppressiven Protokollen kombiniert werden? Welche Auswirkungen haben solche multimodalen Konzepte im Langzeitverlauf nach allogener Nierentransplantation?

3. Material und Methoden

3.1 Tiere und Transplantationstechniken

In allen Experimenten wurden durch Inzucht gezüchtete männliche Ratten (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN), acht bis zehn Wochen alt, mit einem Gewicht von 200-250 g verwendet. Lewis-Ratten (LEW, RT1^l) dienten als Empfänger von Nierenallotransplantaten von Fisher (F344, RT1^{lvj})-Spendern. Die Nieren wurden *in situ* mit 3 ml kalter (4 Grad) laktierter Ringer-Lösung gespült und vor der heterotopischen Transplantation in die großen Gefäße des Wirtsabdomens vorübergehend in derselben Lösung gelagert. Der Harnleiter wurde nach Entfernung der linken Niere „end to end“ an den natürlichen Harnleiter anastomosiert. Die rechte natürliche Niere wurde nach zehn Tagen entfernt, um dem Transplantat Zeit zu geben, sich von jeglicher ischämischen Reaktion zu erholen und eine Überprüfung der Integrität der Harnleiter-Anastomose zu erlauben. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den NIH-Richtlinien zur Pflege und Verwendung von Labortieren mit dem Harvard Research Committee durchgeführt.

3.2 Das Modell des Hirntodes

F344 Spenderratten wurden anästhesiert, und mittels eines Luftröhrenschnittes wurde eine stumpfe Kanüle der Stärke Nr. 13 eingeführt (Luer Stub Adapter, Clay-Adams, Inc., New York, NY). Ein Nr.3 Fogarty arterieller Embolektomiekatheder (Baxter Healthcare Co., Irvine, CA) wurde subdural durch ein okzipitales Bohrloch eingeführt, das mit einer Nadel der Stärke 18 in den Schädel gebohrt worden war. Der Hirntod wurde durch das ca. fünfzehnminütige Aufblasen des Ballons (200 ± 25µl Saline) unter elektroenzephalographischer (EEG) Kontrolle herbeigeführt. Der interarterielle Blutdruck wurde kontinuierlich über einen PE 50 Katheder gemessen, der in die linke Oberschenkelarterie eingeführt, mit einem Blutdrucküberwachungsgerät (Recorder 2200S, Gould Inc., Cleveland, OH) verbunden und über einen Signalgeber (Gould, P23ID) angeschlossen wurde. Ein Blutstau (Herniation) im Hirnstamm wurde durch die physischen Signale, wie maximal erweiterte und fixierte Pupillen, Apnoe und nicht vorhandene Reflexe, sowie durch ein 'flat-line' EEG bestätigt. Die Tiere wurden dann mit einem Nagetier-Respirator (Harvard Rodent Ventilator, Modell 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick, MA) verbunden und mechanisch bei einer Frequenz von

100 Atemzügen/Minute mit einem Volumen von 2.0 ml ventiliert. Sank der systolische Blutdruck während des Hirntodes unter 80 mmHg, so wurde das Tier von den Versuchen ausgeschlossen. Nach sechs Std. wurden die Nieren für die Transplantation entfernt.

3.3 Experimentelle Gruppen

3.3.1 rPSGL-Ig-Versuch

Drei Gruppen (8 Tiere pro Gruppe) wurden untersucht. Die Empfänger von Nieren aus Lebendspendern (LS) desselben Stammes (LEW) dienten als syngene Kontrollen (LEW→LEW (RTT¹), Gruppe 1). LEW-Tiere, denen Transplantate von hirntoten (HT) F344-Spendern (Gruppe 2B und 2C) eingesetzt wurden, dienten als allogene Kontrollen (F344→LEW). Den Empfängern der Gruppen 2B, 2C und 3B, 3C wurde niedrig dosiertes Cyclosporin A (CsA, Novartis Pharmaceuticals Corporation, E.Hannover, NJ) zu 1.5 mg/kg Körpergewicht subkutan 10 Tage lang nach Nierentransplantation verabreicht (Standard-Protokoll), um eine frühe immunologische Aktivität des Wirts zu vermeiden und ein langfristiges Überleben des Transplantates zu ermöglichen (83).

Bei den Tieren der Gruppe 3A-C wurde drei Std. nach der zentralen Beschädigung 50µg rPSGL-Ig in 0,8ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) intravenös injiziert, um vor der Entfernung der zu transplantierenden Niere eine Stimulierung des P- und E-Selektins in dieser zu verhindern (vgl. Seite 3). Den Transplantatempfängern (Gruppe 3B und 3C) wurde unmittelbar nach Transplantation (nach lösen der Klammern) eine zweite Dosis rPSGL-Ig von 50µg intravenös verabreicht (vgl. Tab. 3.3.1.1 und Abb. 3.3.1.2). Die 50µg rPSGL-Ig-Dosierung wurde in Vorversuchen ausgetestet (8). Nach 200 Tagen wurden die Tiere morphologisch untersucht.

PSGL-1 wird von fast allen Teilmengen von Leukozyten exprimiert und von E-, L- und P-Selektin erkannt. Die in dieser Studie verwendete rekombinante lösliche Form besteht, wie bereits einleitend erwähnt (vgl. S.10) aus den ersten extrazellulären 47 Aminosäuren (AS) des humanen PSGL-1 und ist mit humanem IgG1F_C fusioniert (8).

Tab. 3.3.1.1 Spender-Hirntod-Nieren-Transplantations-Behandlungsgruppen des rPSGL-Ig-Versuchs. Syn, syngene; allo, allogene; HT, Spender-Hirntod; LS, Lebendspender; CsA, Cyclosporin A; Gp, Gruppe; rPSGL-Ig, rekombinanter P-Selektin-Glykoprotein-Ligand.

Gruppe (n = 8/Gp)	Spender	Therapie	Untersuchungszeitpunkt
1 syn. Kontrolle	LS	keine	200 Tage nach Transplantation
2 A allo Kontrolle	HT	(ohne CsA - Behandlung)	6 Stunden nach Induktion des HT (entspricht Ende der HT-Phase im Spender)
2 B allo Kontrolle	HT	1,5 mg/CsA /10 Tage	3 Tage nach Transplantation
2 C allo Kontrolle	HT	1,5 mg/CsA /10 Tage	200 Tage nach Transplantation
3 A allo Behandlung	HT	(ohne CsA - Behandlung)+ rPSGL-Ig	6 Stunden nach Induktion des HT (entspricht Ende der HT-Phase im Spender)
3 B allo Behandlung	HT	1,5 mg/CsA /10 Tage + rPSGL-Ig	3 Tage nach Transplantation
3 C allo Behandlung	HT	1,5 mg/CsA /10 Tage + rPSGL-Ig	200 Tage nach Transplantation

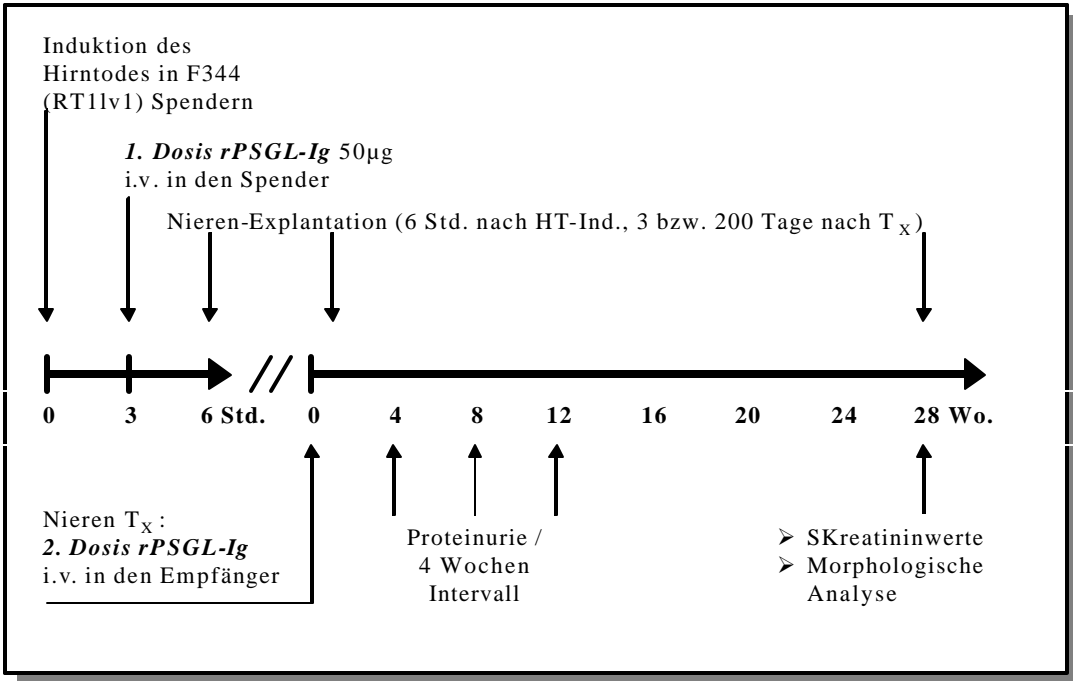


Abb. 3.3.1.2 Schematische Darstellung des rPSGL-Ig-Versuchs. 50µg rPSGL-Ig wurde den Spendern (F344) der Versuchstiere 3A-3C 3 Std. nach HT-Induktion i.v. verabreicht. Eine zweite Dosis von 50µg rPSGL-Ig wurde den Empfänger der Gruppe 3B und 3C nach Beendigung der Transplantation gegeben. Um funktionelle Veränderungen der Nierentransplantate zu bestimmen, wurden im Intervall von 4 Wochen Urinproben entnommen und zusätzlich die Serumkreatininwerte serienmäßig überwacht. Mittels histologischer Paraffinsektionen wurde zudem eine morphologische Beurteilung der Transplantate zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt durchgeführt. F344, Fisher Ratten (Rattenstamm); rPSGL-Ig, rekombinanter P-Selektin- Glykoprotein-Ligand; Tx, Transplantation; HT-Ind., Hirntod-Induktion; Wo., Wochen; T_{EX}, Explantation; SKreatinin, Serumkreatinin; i.v., intravenös.

3.3.2 Sirolimus-Versuch

Die Spender waren entweder anästhesierte, lebende- (LS) oder hirntote (HT) Tiere. Neun Gruppen mit je acht Ratten wurden untersucht. Die Empfänger von LS-isologen (LEW→LEW) Nieren dienten als syngene Kontrollen (Gruppe 4). LEW-Ratten der Gruppe 5, die LS F344 Allotransplantate erhielten, wurden entweder mit einer niedrigen (0,1 mg/kg) oder einer hohen Dosis Sirolimus (0,4mg/kg) mit oder ohne beigefügter Niedrigdosierung CsA behandelt (1.0 mg/kg Körpergewicht, 10 Tage lang). Die reduzierte Dosis von 1,0 mg/kg/Körpergewicht CsA wurde aus Voruntersuchungen in Abstimmung mit Sirolimus ermittelt.

Die Tiere (Gruppe 6), denen Allotransplantate von HT-Spendern transplantiert worden waren, erhielten vergleichbare Immunsuppressiva mit und ohne Beifügung von rPSGL-Ig (50µg rPSGL-Ig in 0,8ml PBS drei Std. nach Induktion des Hirntodes intravenös injiziert und 50µg intravenös unmittelbar nach Beendigung der Transplantation, vgl. Punkt 3.3.1). Nach 150 Tagen wurden die Tiere morphologisch und molekular untersucht (vgl. Tab 3.3.2.1 und Abb. 3.3.2.2).

Tab. 3.3.2.1 Überblick über die Lebendspender- und Spender-Hirntod-Nieren-Transplantations-Behandlungsgruppen des Sirolimus-Versuchs. Gp, Gruppe; Syn, syngene; allo, allogene; LS, Lebendspender; HT, Hirntod-Spender; T_x, Transplantation; CsA, Cyclosporin A; rPSGL-Ig, rekombinanter P-Selektin-Glykoprotein-Ligand.

Gruppe (n=8/Gp)	Spender	Therapie	Untersuchungszeitpunkt
4 syn Kontrolle	LS	keine	150 Tage nach Tx
5A alloBehandlung	LS	CsA 1,5mg/kg/10 Tage	150 Tage nach Tx
5B alloBehandlung	LS	Sirolimus 0,4mg/kg/21 Tage	150 Tage nach Tx
5C alloBehandlung	LS	CsA 1,0mg/kg/10 Tage + Sirolimus 0,4mg/kg/21 Tage	150 Tage nach Tx
5D alloBehandlung	LS	CsA 1,0mg/kg/10 Tage + Sirolimus 0,1mg/kg/10 Tage	150 Tage nach Tx
6A alloBehandlung	HT	Sirolimus 0,4mg/kg/21 Tage	150 Tage nach Tx
6B alloBehandlung	HT	Sirolimus 0,4mg/kg/21 Tage + rPSGL-Ig	150 Tage nach Tx
6C alloBehandlung	HT	CsA 1,0mg/kg/10 Tage + Sirolimus 0,4mg/kg/21 Tage + rPSGL-Ig	150 Tage nach Tx
6D alloBehandlung	HT	CsA 1,0mg/kg/10 Tage + Sirolimus 0,1mg/kg/4.-13. Tag post-Tx + rPSGL-Ig	150 Tage nach Tx
6E alloBehandlung	HT	CsA 1,0mg/kg/10 Tage + Sirolimus 0,4mg/kg/21 Tage	150 Tage nach Tx

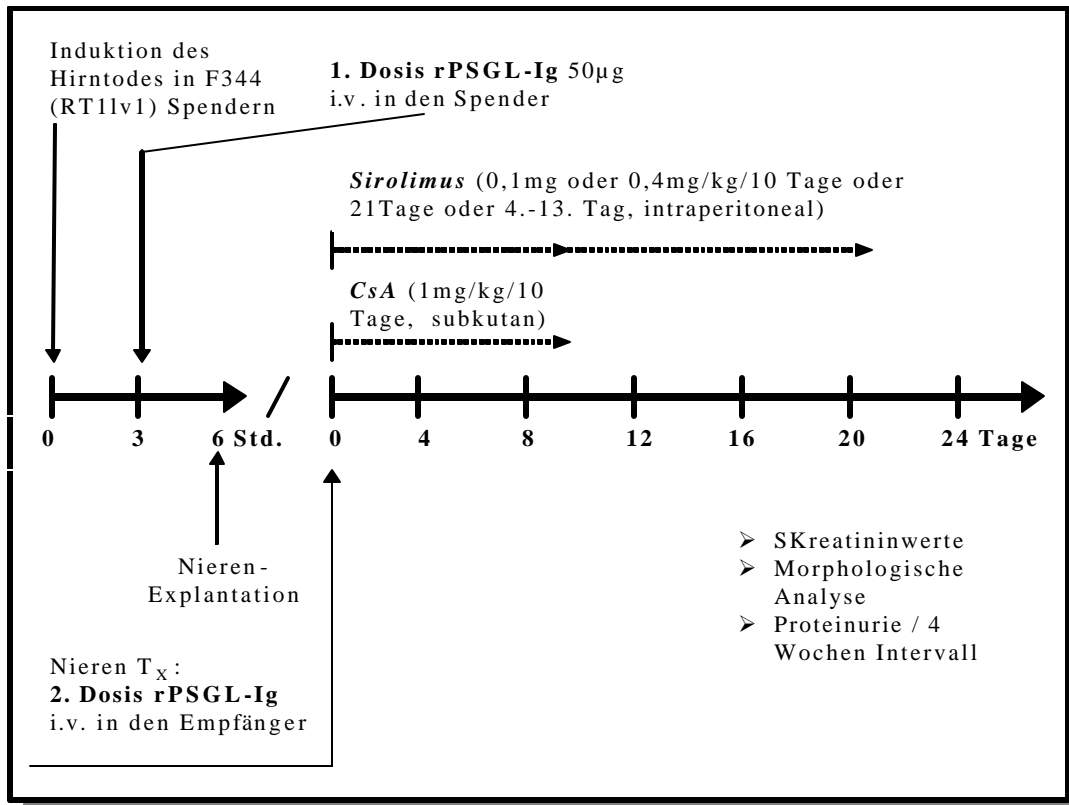


Abb. 3.3.2.2 Schematische Darstellung des Sirolimus-Versuchs. 50µg rPSGL-Ig wurde den Spendern (F344) der Versuchstiere der Gruppe 6B-6D (vgl. Tab. 3.3.2.1) 3 Std. nach HT-Induktion i.v. verabreicht. Eine zweite Dosis von 50µg rPSGL-Ig wurde den Empfängern (Gruppe 6B-6D) nach Beendigung der Transplantation gegeben. Sirolimus wurde 10 oder 21 Tage in einer 0,1 oder 0,4 mg/kg/Körpergewicht-Dosis verabreicht, CsA mit einer Konzentration von 1mg/kg/ Körpergewicht (außer Gruppe 5A, dem Standardprotokoll mit 1,5mg/kg/Körpergewicht) 10 Tage lang. Im Intervall von 4 Wochen wurden Urinproben entnommen, um funktionelle Veränderungen der Nierentransplantate zu bestimmen. Zusätzlich wurde dazu das Serumkreatinin serienmäßig überwacht und eine morphologische Analyse der Transplantate nach 150 Tagen mittels Paraffinsektionen durchgeführt. F344, Fisher Ratten (Rattenstamm); rPSGL-Ig, rekombinanter P-Selektin-Glykoprotein-Ligand; T_x, Transplantation; SKreatinin, Serumkreatinin; CsA, Cyclosporin A; i.v., intravenös.

Sirolimus (Wyeth Research, Cambridge, MA) wurde intraperitoneal, CsA subkutan verabreicht. Jede Substanz wurde in Öl aufgelöst und täglich zur selben Zeit injiziert.

3.4 In vivo-Analysen

Der systolische Blutdruck wurde bei den Empfängern (8 Tiere pro Gruppe) in Intervallen von 2 Wochen, unter Verwendung einer Schwanzmanschette, gemessen. Um die funktionellen Veränderungen im Laufe der Zeit zu bestimmen, wurde wie in Abb. 3.3.1.2 und Abb. 3.3.2.2 dargestellt, alle 4 Wochen von den Empfängern aller Gruppen (n=8/Gruppe) Urin (24 Std.) entnommen. Die Proteinabsonderung wurde durch die Messung der Präzipitation nach Interaktion mit 3% sulfosalizylischer

Säure(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde unter Verwendung des Coleman Junior II Spectrophotometers eine Trübheit durch Schwärzung festgestellt. Die Serumkreatinine wurden durch eine modifizierte Jaffe`s Reaktion auf einem Autoanalysator gemessen (911; Hitachi, Indianapolis, IN).

3.5 In vitro-Analysen

3.5.1 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Bei den transplantierten Tieren wurden die Lymphozyten aus den peripheren Lymphknoten isoliert. Die Organe wurden im Stadium der chronischen Abstoßung oder Akzeptanz des Transplantates (150 bzw. 200 Tage nach der Transplantation) untersucht. Die Lymphknoten wurden mit einem Stempel durch ein Stahlsieb desintegriert. Die so gewonnen Zellen wurden anschließend bei 400 x g zentrifugiert (Sigma 4K10) und mit RPMI 1640 Medium, bestehend aus 10%igem fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol, 5mM HEPES, 1% nicht essentielle Aminosäuren und 1mM Natriumpyruvat (= Kompletmedium; alle Reagenzien von Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gewaschen. Anschließend wurden die Erythrozyten lysiert, die verbleibenden Zellen nochmals gewaschen und gezählt. Die gewonnen Zellen wurden mittels der FACS-Analyse genauer analysiert. Es wurden Doppelfärbungen durchgeführt, wobei mit Antikörper verschiedener Spezifität gearbeitet wurde. Es wurden direkt mit Phykoerythrin (PE) oder Fluoreszein-Isothiocyanat- (FITC) konjugierte Antikörper verwendet. Alle Produkte stammen von der Fa. Serotec, Düsseldorf. Eine Übersicht über die verwendeten Primär-AK ist in Tab. 3.5.1 gegeben.

Für jeden Ansatz wurden 2×10^5 Zellen gefärbt. Hierfür wurden die Zellen mit einem Maus-anti-Ratte-Antikörper (vgl. Tab. 3.5.1) für 25 min im Kühlschrank inkubiert. Die Zellanalysen wurden an einem Ein-Laser-Durchflusszytometer (FACSScan, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt und die Messwerte mit Hilfe der Lysis-II-Software (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) und Win MDI (The Sripps Research Institute) dargestellt.

Tab. 3.5.1 Übersicht der Primärantikörper die zur FACS-Analyse verwendet wurden. Für das Differenzierungscluster 8, wurde ein Mix aus alpha- und beta Kette hergestellt. AK, Antikörper; CD, Differenzierungscluster; NK-Zellen, natürliche Killer-Zellen; PE, Phykoerythrin; FITC, Fluoreszein-Isothiocyanat; IL, Interleukin; IgG1, Immunglobulin vom Subtyp 1.

AK	Spezies	Klon	Isotyp	Zielzelle (Rezeptor)	Format	Katalog-Nr.	Firma
CD4	Maus	W3/25	Maus IgG1	T-Lymphozyten, Makrophagen, Subpopulationen	PE	MCA55PE	Serotec (Düsseldorf)
CD8 alpha-Kette	Maus	MRC OX-8	Maus IgG1	Zytotoxische T-Lymphozyten, T-Suppressor-Zellen	FITC	MCA48FT	Serotec (Düsseldorf)
CD8 beta-Kette	Maus	341	Maus IgG1	Zytotoxische T-Lymphozyten, T-Suppressor-Zellen	FITC	MCA938F	Serotec (Düsseldorf)
CD25	Maus	MRC OX-39	Maus IgG1	NK-Zellen, ruhende Untergruppe von T-Zellen, einige B-Zelllinien (α -Kette des IL-2 Rezeptors; assoziiert mit CD122)	FITC	MCA 273FT	Serotec (Düsseldorf)

3.5.2 Histologie und Immunhistologie

3.5.2.1 Histomorphologische Untersuchungen

Für die morphologische Analyse wurden die Nierentransplantate aller Versuchsgruppen des rPSGL-Ig-Versuchs 6 Std. nach Eintreten des Hirntodes, 3 und 200 Tage nach der Transplantation (vgl. Tab. 3.3.1.1), bzw. aller Versuchsgruppen des Sirolimus-Versuchs 150 Tage nach Transplantation (vgl. Tab. 3.3.2.1) in 10% gepufferten Formalin fixiert. Paraffinsektionen wurden mit Hilfe von Hämatoxylin und Eosin, Periodsäure-Schiff (PAS), Trichrome und Elastinfärbung ausgewertet.

3.5.2.2 Immunhistologie

Zusätzlich wurden Anteile (Kryostatsektionen) der oben genannten Nierentransplantate (vgl. Punkt 3.5.2.1) in Paraformaldehyd-Lysin-Periodat fixiert, schockgefroren und für die Immunhistologie bei -80 Grad gelagert.

Für die Immunhistologie wurden zuerst Einzelfärbungen, anschließend Doppelfärbungen an LEW-Rattengewebe durchgeführt, um die Qualität der AK und deren Konzentration (in $\mu\text{g/ml}$) für eine optimierte Reaktion mit dem Gewebe auszutesten. Zudem wurde ermittelt, welcher AK mit welcher Konjugation

(Markerenzym), entweder Meerrettichperoxidase (HRP, Horseradish Peroxidase) oder alkalische Phosphatase (AP), die beste Bindung darstellt. Um die Zelloberflächenantigene sichtbar zu machen, wurde hierbei eine für das Rattenmodell neue Doppelfärbemethode entwickelt. Mittels dieser sequentiellen immunenzymatischen Doppelfärbung konnten auf dem Rattengewebe erstmalig zwei verschiedene Antigene sichtbar gemacht werden. Das Prinzip dieser Färbung besteht aus jeweils zwei eigenständig, sukzessiv ablaufenden so genannten indirekten Nachweismethoden (85). Das heißt, es bindet ein spezifischer, aber unkonjugierter Primär-AK an das Gewebe, welcher in einem nächsten Schritt mit einem, entweder HRP- oder AP-konjugierten Sekundär-AK gebunden und sichtbar gemacht wird. Zunächst wurden die Gefrierschnitte 10 Minuten in Aceton (Fa. Merck, Darmstadt) fixiert und anschließend luftgetrocknet. Der erste unkonjugierte Primär-AK wurde über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4° C inkubiert. Nach Waschen des Gewebes in 0,5 %igem BSA (PAA, Österreich)-TRIS-HCl (Fa. Merck, Darmstadt)-NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)-Puffer, der mit einem pH-Meter (Fa. WTW, Darmstadt) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde, wurde dem (HRP-) konjugierten (monoklonalen) Sekundär-AK, der spezifisch gegen die Tierspezies des Primär-AK gerichtet ist, 60 Minuten gegeben, um an diesen zu binden. Dieser (erste) Enzym-Substrat-Komplex wurde nun mit einem Chromogen (Fa. Biogenex, Liquid DAB, San Ramon, CA, USA), der sich auf dem Gewebe in einem 'bräunlichen Farbton' darstellt, sichtbar gemacht (vgl. Abb. 3.5.2.1). Dieser bis dahin beschriebene Vorgang gibt auch das Prinzip der Einzelfärbungen für P, E-, L- Selektin und PSGL-1 wieder (vgl. Tab. 4.1.4.2.2 und 4.2.4.2.1).

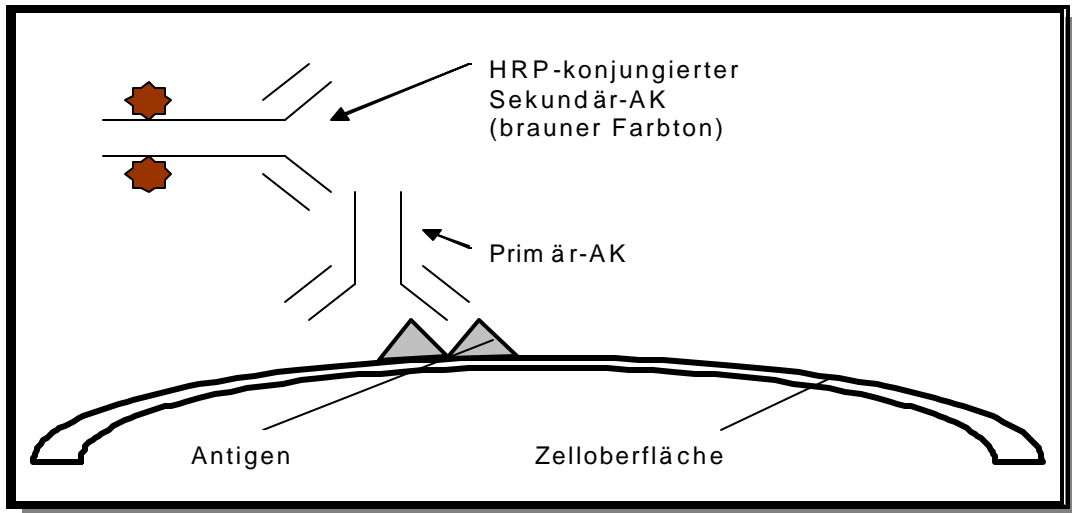


Abb. 3.5.2.1 Schematische Darstellung der indirekten Nachweismethode mit dem ersten Enzym-Substrat-Komplex bestehend aus Primär- und Sekundär-AK. Die HRP-Konjugation stellt sich auf dem Gewebe als bräunlicher Farbton dar. HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); AK, Antikörper.

Darauf folgend wurde nach einem Säure-Eluierungsschritt (Fa. Dako, Hamburg) diese indirekte Nachweismethode wiederholt, um Kreuzreaktionen mit den Reagenzien der folgenden zweiten Färbesequenz zu verhindern, (86). Der Unterschied besteht jedoch darin, dass für den zweiten Sekundär-AK eine AP-Konjugation besteht und dieser mit einem anderen Chromogen (Fa. Dako, Fast Red, Hamburg) angefärbt wurde. Dieser 2. Enzym-Substrat-Komplex stellt sich auf dem Gewebe als 'roter Farbton' dar (vgl. Abb. 3.5.2.2).

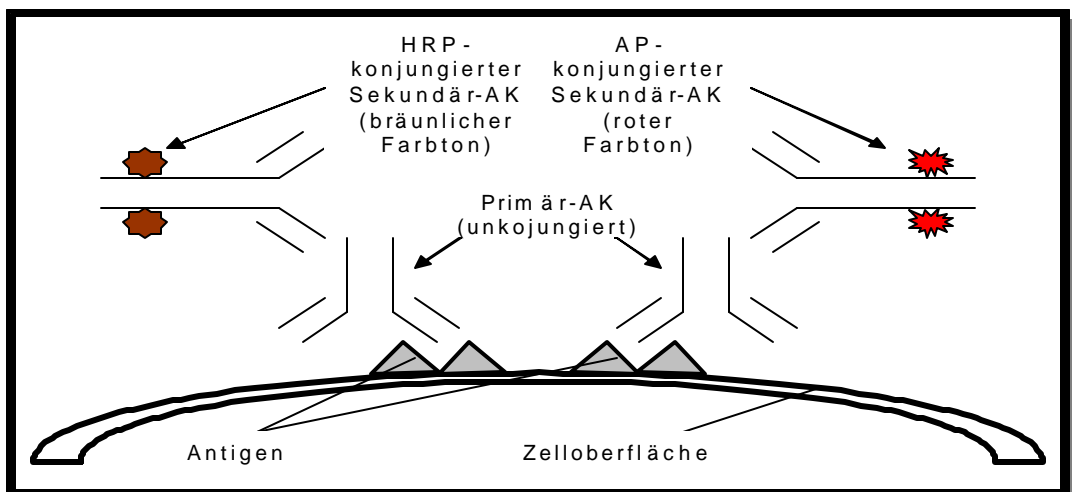


Abb. 3.5.2.2 Schema der fertigen immunenzymatischen Doppelfärbung am Rattengewebe. Darstellt ist die Bindung der Primär-AK und der HRP- (bräunlicher Farbton) bzw. AP- (roter Farbton) konjugierten Sekundär-AK. HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); AP, alkalische Phosphatase; AK, Antikörper.

Nach abschließend zweiminütiger Gegenfärbung in wässrigem Hämalaun, bestehend aus 2,4 g Hämatoxilin (Fa. Merck, Darmstadt), 0,4 g Natriumjodat (Fa. Merck, Darmstadt), 100 g Kaliumaluminiumsulfat (Fa. Applichem, Hartenstein, Würzburg), 2 g Zitronensäure (Fa. Merck, Darmstadt) und 2000 ml destilliertem Wasser (Fa. Delta-Pharma, Pfullingen), wurde das Gewebe mit Glycergel (Fa. Dako, Hamburg) fixiert.

Um Kreuzreaktionen zwischen den Reagenzien der ersten (HRP-) und zweiten (AP-) Färbesequenz zu verhindern, wurde außer dem erwähnten AK-Eluierungsschritt zwischen den einzelnen Färbesequenzen, DAB als Chromogen im ersten Färbeschritt verwendet. Dies hat eine Abschirmung des Immunkomplexes durch das Reaktionsprodukt, den so genannten 'Shielding-Effekt', zur Folge (87). Wenn beide Antigene sehr nahe nebeneinander lokalisiert sind, kann es jedoch nach Färbung des ersten Antigens zu einer Abdeckung des zweiten zu markierenden Antigens kommen.

Um eine unspezifische Hintergrundfärbung und damit eine falschpositive Reaktion durch das Chromogen (Liquid DAB in der ersten-, Fast Red in der zweiten Färbesequenz) zu verhindern, wurden die Primär-AK mit 0,5%igem BSA-TRIS-HCl-NaCl-Puffer verdünnt. Die Möglichkeit einer falschpositiven Reaktion besteht bei Gefrierschnitten auch in der endogenen AP-Enzymaktivität, beispielsweise in Gefäßen. Durch Substitution von Levamisol-Lösung (Fa. Dako, Hamburg) zum Chromogen der zweiten Färbesequenz Fast-Red (Fa. Dako, Hamburg), wurde auch dies verhindert. Auch durch die Verdünnung des Sekundär-AK mit Rattenserum (Fa. Biozol, Eching) wurden falschpositive Reaktionen mit diesem und dem Gewebe verhindert.

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Primär-AK, deren Antigene mit Funktion, sowie über die Zellen die dieses Antigen exprimieren (vgl. Tab. 3.5.2.3). Die adäquaten Sekundärantikörper finden sich in Tabelle 3.5.2.4

Tab. 3.5.2.3 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der verwendeten Primär-AK für die Immunhistologie und enthält Angaben über Wirt und Herkunft des AK, sowie Funktion und Lokalisation des Oberflächenantigens (Rezeptor). CD, Differenzierungscluster; TCR, T-cell-receptor (T-Zellrezeptor); MHC, Major Histokompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex); HIV, Human immunodeficiency virus; Gp 120, Transmembranprotein des HIV (Rezeptor), das CD4 bindet; NK-Zellen, natürliche Killerzellen; GlyCAM, (Endothelzell-) Rezeptor für L-Selektin; IL, Interleukin; APC, Antigen präsentierende Zelle; TNF, Tumornekrosefaktor.

Nr.	Firma (und Wirt)	Rezeptor (Antigen)	Zellen, die das AG exprimieren	Funktionen
1	Biozol, Eching, BZL03073 (Maus)	$\alpha\beta$ TCR	T-Zellen (90%)	Erkennung fremder Antigene (\rightarrow intrazelluläre Signalübertragung \rightarrow aktivierter Zustand)
2	Serotec, Düsseldorf, MCA55R (Maus)	CD4	Einige Gruppen von Thymozyten, T-Helferzellen, inflammatorischen T-Zellen (etwa 2/3 der periph. T-Zellen), Monozyten, Makrophagen	Corezeptor für MHC Klasse II-Moleküle (Rezeptor für gp120 von HIV-1 und HIV-2)
3	Pharmingen, Heidelberg, CD8a:22071D (Maus) CD8b22501D (Maus)	CD8	Einige Gruppen von Thymozyten, zytotoxische T-Zellen (etwa 1/3 der peripheren T-Zellen)	Corezeptor für MHC Klasse I-Moleküle
4	Serotec, Düsseldorf, MCA494G (Maus)	CD25	Aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten	α -Kette des IL-2 Rezeptors; assoziiert mit CD122 (NK-Zellen, ruhende Untergruppe von T-Zellen, einige B-Zelllinien) und der IL-2R γ -Kette
5	Serotec, Düsseldorf, MCA1331 (Maus)	CD28	Untergruppe von T-Zellen (CD4 und CD8 T-Zellen), aktivierte B-Zellen	Aktivierung naiver T-Zellen; Rezeptor costimulierendes Signal (Signal2); bindet B7-1 und B7-2
6	Pharmingen, Heidelberg, 551451 (Maus)	CD45RC	B-Vorläuferzellen, B-Zellen, Untergruppe von CD4T-Zellen (Gedächtniszellen), aktivierte T-Zellen, CD8 Suppressor- und zytotoxische T-Zellen	(komplexe Rolle der) T-Zell- und B-Zell-Antigen Signaltransduktion
7	Serotec, Düsseldorf, MCA1419 (Maus)	CD62L (L-Selektin)	B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, Neutrophile	Leukozyten-Adhäsionsmolekül (LAM); bindet CD34 (hämatopoetische Vorläuferzellen, Kapillarendothel); GlyCAM; vermittelt das Entlangrollen am Endothel
8	SantaCruz, USA, sc-6941 (Ziege)	CD62P (P-Selektin)	Blutplättchen, Megakaryozyten, Endothel	Adhäsionsmolekül; bindet Sialyl-Lewis-x; vermittelt die Interaktion zwischen Blutplättchen und Endothel bzw. Monozyten sowie das Entlangrollen von Neutrophilen am Endothel
9	SantaCruz, USA, sc-140011 (Hase)	CD62E (E-Selektin)	Endothel	Endothel-Leukozyten Adhäsionsmolekül (ELAM); bindet Sialyl-Lewis-x; vermittelt das Entlangrollen der neutrophilen Zellen am Endothel
10	Serotec, Düsseldorf, MCA1961 (Maus)	CD80 (B7-1)	Untergruppe aktivierter B-Zellen, APC	Costimulator – Optimierung der T-Zell Aktivierung; Ligand für CD28 und CTLA-4
11	Serotec, Düsseldorf, MCA1962 (Maus)	CD86 (B7-2)	Monozyten, aktivierte B-Zellen, dendritische Zellen (APC)	Costimulator – Optimierung der T-Zell Aktivierung; Ligand für CD28 und CTLA-4; B-Zellaktivierung;
12	SantaCruz, USA, sc-9094 (Hase)	CD152 (CTLA-4)	Aktivierte T-Zellen (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4)	Ligand von B7-1 (CD80), B7-2 (CD86); negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung
13	SantaCruz, USA, sc-10176 (Ziege)	PSGL-1	Leukozyten	Adhäsionsmolekül für P-/E-/L-Selektin
14	Serotec, Düsseldorf, MCA45G (Maus)	Ox 3 (MHC Klasse II)	B-Zellen, CD4 T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen	Antigenpräsentation (\rightarrow intrazelluläre Signalübertragung \rightarrow aktivierter Zustand)
15	Serotec, Düsseldorf, MCA341R (Maus)	ED1	Makrophagen, Monozyten	Säurephosphataseaktivität

Tab. 3.5.2.4 gibt die verwendeten Sekundär-AK für die Immunhistologie mit Herkunft und Wirt, sowie deren Konjugation und Funktion wieder. HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); AP, alkalische Phosphatase; AK, Antikörper.

Nr.	Firma [und Wirt]	Art der Konjugation	gerichtet gegen (Funktion)
1	DAKO, Hamburg DO314 [Hase]	AP	Maus (Primär-AK)
2	DAKO, Hamburg PO161 [Hase]	HRP	Maus (Primär-AK)
3	DAKO, Hamburg DO487 [Ziege]	AP	Hase (Primär-AK)
4	DAKO, Hamburg DO160 [Hase]	HRP	Ziege (Primär-AK)
5	CALTAG, Burling, CA, USA LL42007 [Ziege]	HRP	Hase (Primär-AK)

3.5.3 RNase-Protektions-Test

Um die Expression von repräsentativen Zytokinen zu analysieren, die für anfängliche, nicht spezifische entzündliche Erscheinungen nach der Transplantation (3 Tage) und auch für die chronische Abstoßung (150 Tage) von Bedeutung sind, wurden Teile der Nierenrinde (n=8/Gruppe) entnommen, schockgefroren und bei -80° für molekulare biologische Untersuchungen gelagert. Die Expression dieser Zytokine wurde mit Hilfe des RNase-Protektions-Tests bewertet. Die gesamte RNA wurde mit einer RNazol B Lösung (Fa. Sigma-Aldrich, München) gewonnen und unter Verwendung von Trizol isoliert (88). Der RNase-Protektions-Test wurde unter Anwendung des RiboquantTM Multi-Probe RNase-Testsystems (Fa. Pharmingen, San Diego, CA, USA) durchgeführt. ³²P-gekennzeichnete Proben wurden von einem rCK-1 Multi-Probe Template Set (Fa. Pharmingen, Heidelberg) synthetisiert und über Nacht mit RNA-Proben hybridisiert. Diese wurden zur Aufspaltung mit RNase und einer T1-Mischung in RNase-Puffer inkubiert, die geschützten Proben wurden gereinigt und auf einem 5% Acrylamidgel in den 0,5% TBE-Puffer aufgetragen. Die Kontroll-RNA und eine Lösung des Probesets (zur Größenmarkierung) wurden parallel eingeführt. Das Gel wurde auf ein Filterpapier gelegt, getrocknet und auf Kodak-Photopapier bei -70° 24 Std. lang belichtet und mit Hilfe eines Phosphoimagers, unter Anwendung der Imagequant Software, analysiert (NIH-Software). Der beschriebene RNase-Protektions-Test wurde nur mit Tieren des Sirolimus-Versuches durchgeführt (vgl. Tab. 3.3.2.1).

3.5.4 Real Time Polymerase-Kettenreaktion (Real Time-PCR)

Die Expression von repräsentativen Chemokinen und Wachstumsfaktoren, MCP-1 und TGF- β , die bei dem RNase Protection-Test nicht gemessen wurden, wurden zusammen mit IL-1 β und TNF- α durch die Real Time-PCR in Nierenallotransplantaten (n=8/Gruppe) in den Gruppen 4, 5C, 5D, 6A-6C und 6D gemessen (89-91). Mit Hilfe der Säure Guanidium Isothiocyanat-Phenol Chloroform Extraktion wurde die RNA aus dem schockgefrorenen Nierengewebe isoliert (92). cDNA wurde unter Anwendung von 2 μ g hitzedenaturierter RNA präpariert. Die folgenden Sequenzen wurden verwendet (Fa. Sigma, Gnosys Woodlands, TX, USA): 5'-ATG GCA CAG TCA AGG CTG AGA-3' und 5'-CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT-3', IL-1 β 5'-TGC ACT ACA GGC TCC GAG ATG-3' und 5'-TGG AGA GCT TTC AGC TCA TAT GG-3', TNF- α 5'-ACA AGG CTG CCC CGA CTA C-3' und 5'-TCC TGG TAT GAA ATG GCA AA-3', MCP-1 5'-CAG ATC TCT CTT CCT CCA CCA CTA T-3' und 5'-CAG GCA GCA ACT GTG AAC AAC-3', and TGF- β 5'-GCT GCT GAC CCC CAC TGA T-3' und 5'-GCC ACT GCC GGA CAA CTC-3'. Die Primer wurden unter Anwendung der Primer Express Software für Primerdesign entworfen, um die kurzen Segmente der 50-150 Basispaare der vorgegebenen cDNA zu erweitern. Eine optimale Primerkonzentration wurde durch die Durchführung der Primertitration erreicht. Eine quantitative Real Time PCR wurde in einer zwei-Schritt-RT-PCR, unter Anwendung von SYBR Green PXR Master Mix (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) mit 100 ng cDNA und 300 nM Primern, in einem Gesamtvolumen von 50 μ l durchgeführt. Der PCR-Thermalzyklus bestand aus zehnjährigen Erhitzen auf 95°, gefolgt von 40 fünfzehnsekündigen Erhitzungszyklen auf 95° und einer sechzigsekündigen Abkühlung auf 60°. Genspezifische Produkte wurden kontinuierlich mit Hilfe des ABI Prism 7700-Sequenzdetektors (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gemessen und die relative Quantität, wie vom Hersteller empfohlen, kalkuliert. Alle Muster wurden in Duplikaten ausgeführt und während der Datenanalyse durch den Referenz-Farbstoff von SYBR Green PC Master Mix normalisiert, um 'well-to-well' fluoreszierende Lösungen zu korrigieren. Um die Zielvorlage mengenmäßig zu bestimmen, wurde der durchschnittliche CT-Wert ('threshold cycle'), also die Anzahl der Zyklen innerhalb derer die Fluoreszenz des Reporters eine fixierte Schwelle (threshold) oberhalb der Basiswerte erreicht, gemessen. Dann wurde die Differenz (Δ CT) zwischen den

durchschnittlichen CT-Werten, der Muster in den vorgegebenen Wells und denen des 'Housekeeping' Gens (Referenzgen), GAPDH ermittelt. Daraufhin wurde die Differenz ($\Delta\Delta CT$) zwischen den durchschnittlichen ΔCT -Werten der Muster für jedes 'Target' und der ΔCT -Wert des Kontrollmusters für jedes 'Target' errechnet. Dieser relative Quantifizierungswert, die Menge, wird als $2^{-\Delta\Delta CT}$ ('Fold Change') bezeichnet. Die beschriebene Real Time-PCR wurde nur mit Tieren des Sirolimus-Versuches durchgeführt (vgl. Tab. 3.3.2.1).

3.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Jede der oben aufgeführten Untersuchungen wurde mindestens bei einem Minimum von acht Ratten durchgeführt. Die Vergleiche wurden zweckentsprechend entweder mit ANOVA, oder durch paarweise oder alleinige T-Tests durchgeführt. Zur Bestimmung des Bedeutungswertes von p wurde Bonferronis statistische Methode für vielfältige Vergleiche verwendet. $p < 0,05$ wurde als bedeutend angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 rPSGL-Ig-Versuch

Zur Untersuchung des Risikofaktors Hirntod für die Entwicklung der chronischen Abstoßung wurde das etablierte Rattenmodell F344/LEW verwendet. Analysiert werden sollte, ob durch die Gabe einer rekombinanten löslichen Form von P-Selektin-Glykoprotein-Ligand (rPSGL-Ig) die frühen unspezifischen Veränderungen in den Nieren des hirntoten Spenders normalisiert werden können (vgl. S. 10), und ob eine Verbesserung der anfänglichen Veränderungen die Progression der chronischen Allotransplantatabstoßung mit der Zeit verändert (vgl. S. 4-5).

4.1.1 Überlebensdaten

Alle unbehandelten und mit rPSGL-Ig behandelten Tiere (Gruppe 2C und 3C) überlebten den Beobachtungszeitraum von 200 Tagen. Nach initialem Blutdruckanstieg, bedingt durch die Ausschüttung von Katecholaminen während der Induktion des Hirntodes, kam es zu einem durchschnittlich arteriellen Blutdruckwert von 80-100 mmHg während der Beobachtungszeit.

4.1.2 Nierenfunktion

Die Empfänger aller Gruppen wurden sequenziell in vierwöchigen Intervallen auf ihre Proteinausscheidung im Harn als ausgezeichnete Bestimmungsgröße der Nierenfunktion in diesem chronischen Abstoßungsmodell hin überprüft. Syngene Tiere wiesen zu keinem Zeitpunkt eine Proteinurie auf (Gruppe 1: 18,2 mg / 24 Std. 200 Tage nach Transplantation (Tx)). Empfänger mit Transplantaten aus hirntoten Spendern (Gruppe 2C) ohne rPSGL-Ig-Behandlung zeigten ab dem 90. Tag eine erhöhte Proteinausscheidung mit stark erhöhten Werten zum Beobachtungsende (Gruppe 2C: 274,6 mg / 24 Std. 200 Tage nach Tx). Empfänger der Gruppe 3C mit rPSGL-Ig Behandlung entwickelten während der gesamten Folgezeit keine Proteinurie (Gruppe 3C: 24,9 mg / 24 Std. 200 Tage nach Tx) (vgl. Abb. 4.1.2.1).

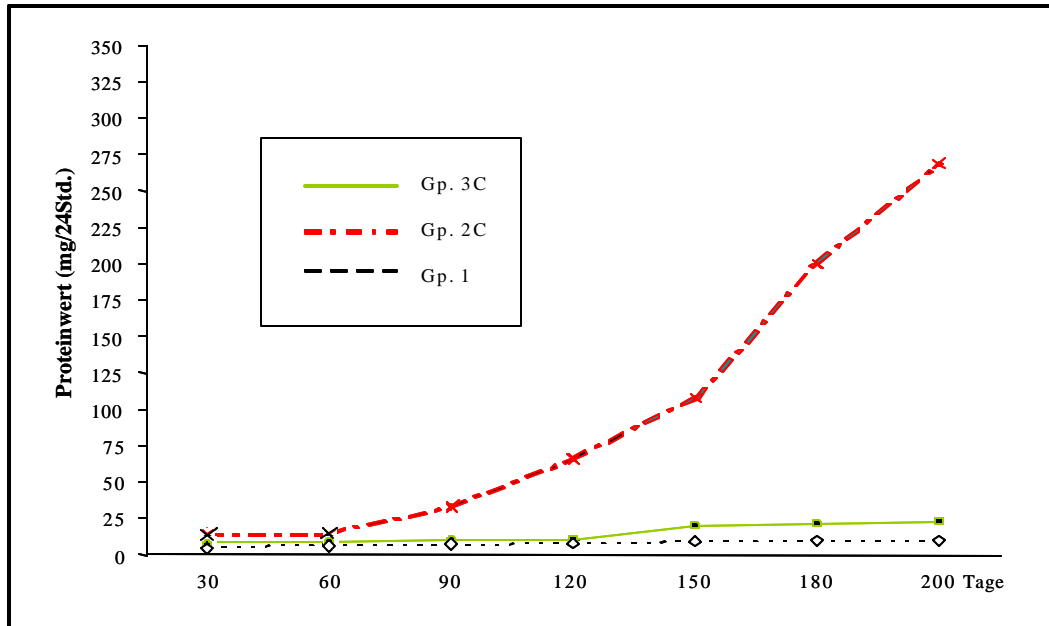


Abb. 4.1.2.1 zeigt die Proteinausscheidung in Empfängern mit und ohne rPSGL-Ig Behandlung. Die Proteinausscheidung in Empfängern mit rPSGL-Ig Behandlung war auf das Niveau syngener Kontrollen reduziert (Gruppe 3C vs. 1). Gruppe 1, syngene Kontrolle (schwarze Linie); Gruppe 2C, allogene Kontrolle, ohne rPSGL-Ig Behandlung (rote Linie); Gruppe 3C, allogene Behandlung, mit rPSGL-Ig behandelte Tiere (grüne Linie); Gruppe 2C vs. Gruppe 3C $p < 0,001$; Gp., Gruppe.

Für eine zusätzliche Bewertung der Nierenfunktion wurden die Werte des Serumkreatinins nach der Transplantation in allen Gruppen serienmäßig überwacht. Das Serumkreatinin war zum Zeitpunkt 200 Tagen post-op bei unbehandelten Empfängern der Gruppe 2C im Vergleich zu denen mit rPSGL-Ig Behandlung (Gruppe 3C) deutlich erhöht (Gruppe 2C: 2,84 mg / dl vs. Gruppe 3C: 0,68 mg / dl 200 Tage nach Tx). Bei behandelten Empfängern war damit im Vergleich zur syngenen Kontrolle (Gruppe 1) keine signifikante Erhöhung des Serumkreatinins festzustellen (Gruppe 3C: 0,68 mg / dl vs. Gruppe 1: 0,53 mg / dl 200 Tage nach Tx) (vgl. Abb. 4.1.2.2).

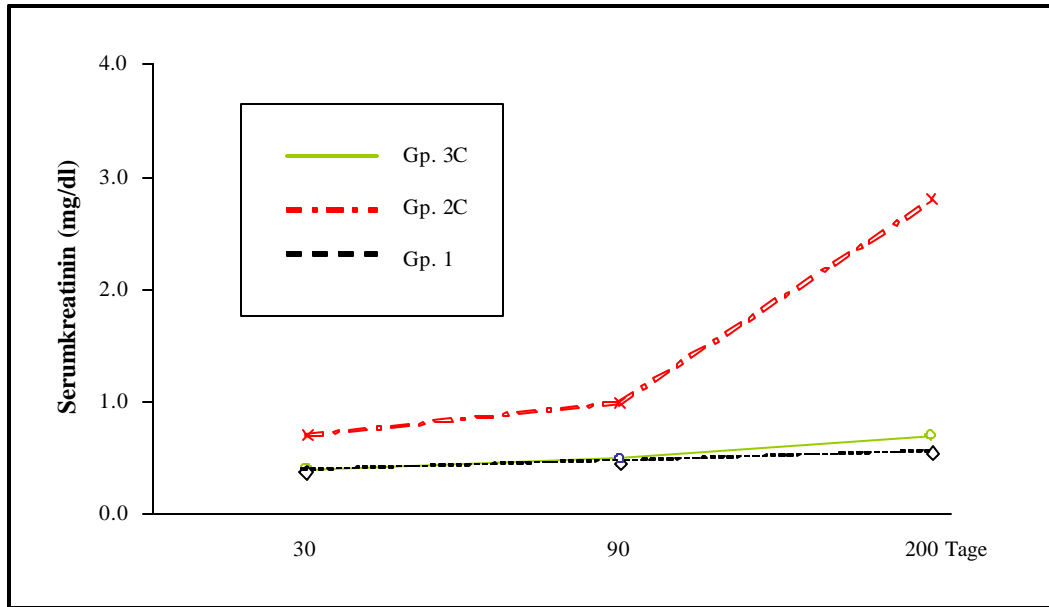


Abb. 4.1.2.2 Die Serumkreatininwerte zeigen ein Muster, das vergleichbar ist mit dem der Proteinurie der verschiedenen Gruppen (vgl. Abb. 4.1.2.1). Deutlich erhöhte Kreatininwerte bei unbehandelten Tieren der Gruppe 2C (rote Linie) zum Beobachtungsende (200 Tagen post-op). Gruppe 1, syngene Kontrolle (schwarze Linie); Gruppe 2C, allogene Kontrolle, ohne rPSGL-Ig behandelte Tiere (rote Linie); Gruppe 3C, allogene Behandlung, mit rPSGL-Ig behandelte Tiere (grüne Linie); Gruppe 2C versus Gruppe 3C $p < 0,001$; Gp., Gruppe.

4.1.3 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Die langzeitüberlebenden und funktionell unbeeinflussten Tiere mit rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 3C) wurden durchflusszytometrisch auf vorhandene regulatorische Zellen in den paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten hin untersucht. Dazu wurde zunächst die Gesamtzahl der CD3+CD4+ T-Zellen bestimmt. In Tieren mit rPSGL-Ig-Behandlung fanden sich verhältnismäßig weniger CD3+CD4+ Zellen (Gruppe 2C: 47,8% vs. Gruppe 3C: 30,2%) (Daten nicht aufgezeigt). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Gruppe 2C) zeigten sich in den behandelten Tieren (Gruppe 3C) deutlich mehr CD4+CD25+ Zellen (Gruppe 2C: 2,8% vs. Gruppe 3C: 8,2%). Dieses Ergebnis weist auf peripher vorhandene regulatorische T-Zellen als mögliche Erklärung für das langfristig unbeeinflusste Transplantatüberleben hin (vgl. Abb. 4.1.3).

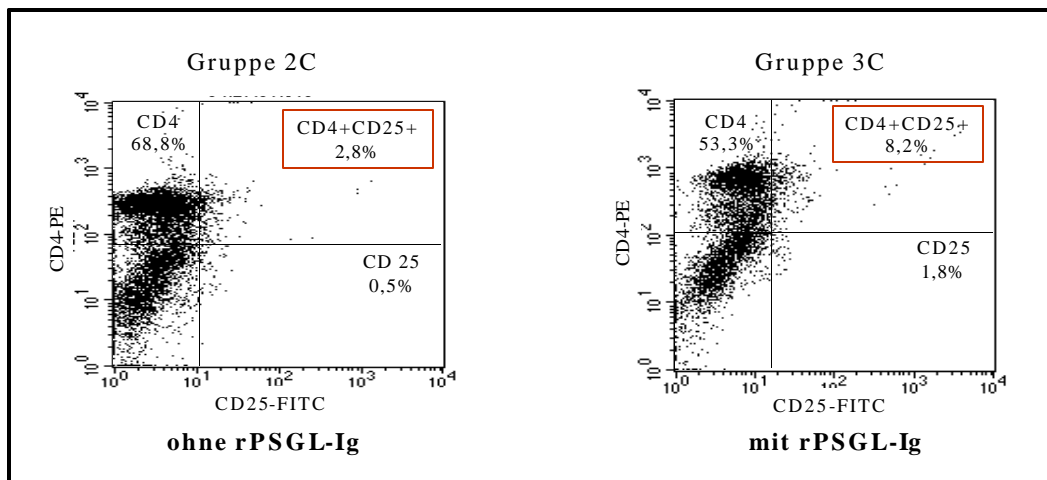


Abb. 4.1.3 Durchflusszytometrische Untersuchung zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+) in den paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten aus Tieren mit Nieren hirntoter Spender ohne rPSGL-Ig (Gruppe 2C) verglichen mit Tieren mit rPSGL-Ig Behandlung (Gruppe 3C) 200 Tage nach Transplantation. Die Abbildung ist repräsentativ für 8 untersuchte Tiere pro Gruppe. CD4, T-Helferzellen; CD25, aktivierte T-Zellen; PE, Phykoerythrin; FITC, Fluoreszein-Isothiozyanat; CD, Differenzierungscluster.

4.1.4 Histologie / Immunhistologie

4.1.4.1 Histomorphologische Ergebnisse

Abgesehen von einer geringfügigen tubulären Schwellung erschienen die Nieren 6 Std. nach Eintreten des Hirntodes und nach Entnahme aus dem Spender morphologisch normal (Gruppe 2A und 3A). Allogene Lebendspendernieren waren drei Tage nach Transplantation ebenfalls wie syngene Transplantate (Gruppe 1) unverändert (Daten nicht aufgezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten Transplantate aus hirntoten Spendern (Gruppe 2B) eine starke tubuläre Nekrose mit weitreichenden perivaskulären polymorphnukleären Leukozyten (PMN) und mononukleären Zellinfiltraten. Nieren behandelter Empfänger der Gruppe 3B zeigten nur eine fokal tubuläre Nekrose am korticomedullären Übergang und nur wenige PMN. 200 Tage nach Transplantation zeigten die Nieren aus Lebendspendern zunehmende Veränderungen einer chronischen Abstoßung mit weitreichender Glomerulosklerose (>50%), einer Rarefizierung der Gefäßarchitektur, einer erhöhten mesangialen Matrix und einer mesangialen Zellproliferation (Daten nicht aufgezeigt). Transplantate aus hirntoten Spendern der Gruppe 2C befanden sich im Endstadium einer chronischer Abstoßung und wiesen eine starke Glomerulosklerose (>90%), interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie sowie eine dichte Zellinfiltration auf. Der morphologische Aufbau dieser Transplantate war weitgehend zerstört. Gegensatz dazu glichen die Transplantate mit rPSGL-Ig

behandelter Tiere der Gruppe 3C den syngenem Transplantaten (Gruppe 1) und zeigten minimale Veränderungen (<10%) auf. Diese Transplantate waren im Wesentlichen normal (vgl. Abb. 4.1.4.1).

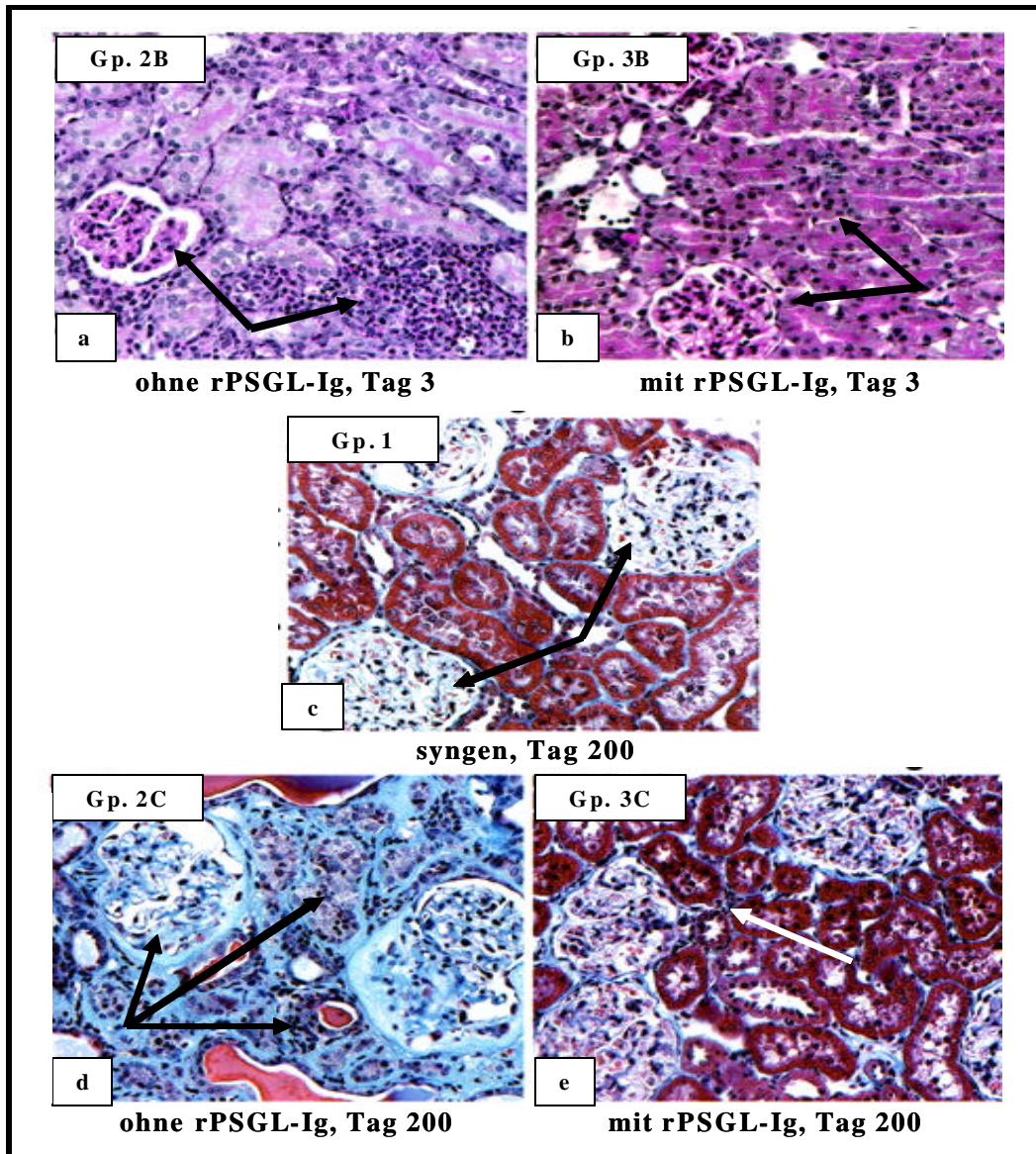


Abb. 4.1.4.1 zeigt das histomorphologische Bild von Rattennierentransplantaten ohne (Gruppe 2B und 2C) und mit rPSGL-Ig Behandlung (Gruppe 3B und 3C) zum Zeitpunkt 3 Tage nach Transplantation (Gruppe 2B und 3B) und 200 Tage post-op (Gruppe 2C und 3C). Die Bilder a und b zeigen PAS gefärbte repräsentative Abschnitte aus Transplantaten 3 Tage nach Transplantation. Die darauf folgenden Bereiche c-e zeigen Trichrom Färbungen von Nierentransplantaten 200 Tage nach Transplantation. Während Transplantate ohne rPSGL-Ig Therapie am 3. Tag (Gruppe 2B, vgl. Abb. 4.1.4.1 a) ein umfangreiches neutrophilreiches Infiltrat aufwiesen, führte die rPSGL-Ig-Therapie zu diesem Zeitpunkt (Gruppe 3B, vgl. Abb. 4.1.4.1 b) neben einer minimalen tubulären Schädigung zu einer nur geringen fokalen mononuklearen Zellinfiltration. Am 200. Tag wiesen syngene Transplantate eine gewisse Hypertrophie der Glomeruli auf, waren aber sonst gut erhalten (Gruppe 1, vgl. Abb. 4.1.4.1 c). Transplantate aus hirntoten Spendern ohne rPSGL-Ig-Behandlung zeigten eine fortgeschrittene Schädigung (Gruppe 2C, vgl. Abb. 4.1.4.1 d). Mit rPSGL-Ig behandelte Tiere wiesen in ihren Transplantaten eine fast normale Struktur auf (Gruppe 3C, vgl. Abb. 4.1.4.1 e) die mit der syngenem Kontrolle vergleichbar waren (Gruppe 1, vgl. Abb. 4.1.4.1 c). Färbungen repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe / Zeitpunkt. Vergrößerung x300; Gp., Gruppe.

4.1.4.2 Ergebnisse der Immunhistologie

Zur Beurteilung der immunenzymatischen Einzel- und Doppelfärbungen (vgl. Tab. 4.1.4.2.2 und Tab. 4.2.4.2.1) wurde die nachfolgende Bewertungstabelle verwendet. Um in der Doppelfärbung auch das Ausmaß der Gesamtreaktion beurteilen zu können, wurde das Schema für die Kriterien der Einzelfärbungen (vgl. Tab. 4.1.4.2.1 (B), für P-, E-, L- Selektin, PSGL-1) ebenfalls für die Beurteilung der sich singular (selektiv) in der Doppelfärbung darstellenden HRP- und AP- markierten AK angewandt. Den Kriterien der Doppelmarkierung (vgl. Tab. 4.1.4.2.1 (A)) liegen das Ausmaß von Kolokolisation und Zell-Interaktion der HRP- und AP- Markierung zugrunde.

Tab. 4.1.4.2.1A und B geben die Bewertungskriterien für Einzel- und Doppelfärbungen von Tab. 4.1.4.2.2 und 4.2.4.2.1 wieder. Die Kriterien der Einzelfärbung (B) gelten sowohl für P-, E-, L- Selektin und PSGL-1 als auch für die sich einzeln darstellenden Enzym-Substrat-Komplexe in der Doppelfärbung. Die Beurteilung der Intensität von Kolokolisation und Zell-Interaktionen der (bräunlichen) HRP- und (roten) AP-Färbung in der Doppelmarkierung sind in Tab. 4.1.4.2.1A dargestellt.

(A) Doppelfärbung		(B) Einzelfärbung	
(+)	selten	(+)	$x < 10\%$
+	mild	+	10%-20%
++	moderat	++	20%-40%
+++	stark	+++	40%-60%
		++++	60%-80%
		+++++	80%-100%
-	keine Reaktion	-	keine Reaktion

Tab. 4.1.4.2.2 Ergebnisse der Doppel- und Einzelfärbungen des rPSGL-Ig-Versuchs.

Doppel-färbungen	Ohne Behandlung (Gp1)	OhneCsA, ohne rPSGL-Ig, nach 6 Stunden (Gp2A)	OhneCsA, mit rPSGL-Ig, nach 6 Stunden (Gp3A)	1,5mg/kg CsA, ohne rPSGL-Ig, nach 3 Tagen (Gp2B)	1,5mg/kg CsA, mit rPSGL-Ig, nach 3 Tagen (Gp3B)	1,5mg/kg CsA, ohne rPSGL-Ig, nach 200 Tagen (Gp2C)	1,5mg/kg CsA, mit rPSGL-Ig, nach 200 Tagen (Gp3C)
TCR/MHC Klasse II	+	-	-	(+)	-	+	+++
	(+/+++)	((+)/(+))	((+)/(+))	(+)/(+)	(+)/(+)	(+++)/(+++)	(+++)/(+++)
CD4/CD8	+	-	-	(+)	-	++	+
	(+++)/(+++)	(+)/(+)	((+)/(+))	(+)/(+)	((+)/(+))	(+++)/(+++)	(+)/(+++)
CD4/CD25	+	-	(+)	-	-	+	+++
	(+++)/(+)	(+)/(+)	((+)/(+))	(+)/(+)	((+)/(+))	(+++)/(+)	(+++)/(+++)
CD4/CD45RC	+	n.t.	n.t.	nt.	n.t.	+	++
	((+)/(+))	n.t.	n.t.	nt.	n.t.	(+++)/(+)	(+++)/(+++)
CD8/CD25	+	(+)	-	-	-	(+)	++
	(+)/(+)	(+)/(+)	(+)/(+)	(+)/(+)	((+)/(+))	(+++)/(+)	(+++)/(+++)
CD8/CD45RC	(+)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	(+)	+
	(+)/(+++)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	((+)/(+))	((+)/(+)
CD8/ED-1	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	++	++
	(+)/(+++)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	(+++)/(+++)	(+++)/(+++)
B7-1/CTLA-4	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)
	((+)/(+))	(+)/(+)	((+)/(+))	(+)/(+++)	(+)/(+++)	(+)/(+++)	(+)/(+++)
B7-2/CTLA-4	-	(+)	(+)	(+)	(+)	+	++
	((+)/(+++)	((+)/(+))	((+)/(+))	((+)/(+)	((+)/(+))	(+)/(+++)	(+++)/(+++)
B7-1/CD28	-	(+)	-	(+)	(+)	+	+
	((+)/(+))	(+)/(+)	((+)/(+))	(+)/(+)	((+)/(+))	(+++)/(+++)	(+)/(+)
B7-2/CD28	-	+	+	(+)	(+)	++	(+)
	((+)/(+))	(+++)/(+++)	(+)/(+)	((+)/(+)	((+)/(+))	(+++)/(+++)	((+)/(+++)
CTLA-4/CD28	-	(+)	++	(+)	(+)	-	++(+)
	(+)/(+)	(+++)/(+++)	(+++)/(+++)	(+)/(+++)	(+)/(+++)	(+++)/(+)	(+++)/(+++)
CTLA-4/CD4	-	n.t.	n.t.	nt.	n.t.	-	+
	(+)/(+)	n.t.	n.t.	nt.	n.t.	(+++)/(+)	(+++)/(+++)
CTLA-4/CD8	-	n.t.	n.t.	nt.	n.t.	++	(+)
	(+)/(+)	n.t.	n.t.	nt.	n.t.	(+++)/(+++)	(+++)/(+++)
B7-1/ED-1	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+	(+)
	(+)/(+++)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	(+++)/(+++)	(+)/(+++)
B7-2/ED-1	(+)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	++	(+)
	((+)/(+++)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	(+++)/(+++)	(+)/(+++)
CTLA-4/ED-1	(+)	++	++(+)	(+)	++	+	(+)
	(+)/(+++)	(+++)/(+++)	(+++)/(+++)	(+)/(+++)	(+++)/(+++)	(+++)/(+++)	(+++)/(+++)
Einzelfärbungen							
P-Selektin	++(+)	(+)	(+)	+++(+)	++++	++++	+++
E-Selektin	++++	++++	++++	++	(+)	++++	++++
L-Selektin	+	++	(+)	+++	+++	++(+)	++
PSGL-1	++	+	(+)	+++	+	++++	++

Die relevanten Ergebnisse sind in der Tabelle schattiert dargestellt und werden im Text erläutert. Da vereinzelt für Gruppe 2A - 3B nicht genügend Gewebe vorhanden war, konnten diese nicht ausgewertet werden (n.t.). Der jeweils zuerst genannte Antikörper der Doppelfärbungskombination ist mit HRP (bräunlicher Farbton), der zweit genannte mit AP (roter Farbton) konjugiert. Das Ergebnis oberhalb der Klammer gibt Auskunft über das Ausmaß von Kolokalisation und Zell-Interaktion der Doppelmarkierung. Das Ergebnis unterhalb (in Klammern) gibt die Intensität der jeweiligen Einzelfärbungen in der Doppelmarkierung wieder, die mit einem Querbalken (/) voneinander abgegrenzt sind. Die Einzelfärbungen (P-, E-, L-, Selektin und PSGL-1) sind ausschließlich mit HRP konjugiert. AP, alkalische Phosphatase; APC, Antigen präsentierende Zelle; CD, Differenzierungscluster; HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); HT, Hirntod; CTLA4, cytotoxic Tlymphozyte associated protein 4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4); CsA, Cyclosporin A; LS, Lebendspender; MHC, Major Histokompatibilität Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex); PSGL-1, P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1; rPSGL-Ig, rekombinanter P-Selektin-Glykoprotein-Ligand mit humanem IgG1; TCR, T-cell-receptor (T-Zellezeptor); Gp., Gruppe.

Um zu überprüfen, ob es zu einer Signalübertragung zwischen T-Zellen und APC kam, wurden Doppelfärbungen mit Markierung des T-Zellrezeptors (TCR) und des MHC Klasse II Komplexes (Signal 1) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Erkennung fremder Antigene in Tieren die rPSGL-Ig erhalten haben (Gruppe 3C), auch noch 200 Tage nach Transplantation wesentlich deutlicher ausgeprägt war, als in Tieren ohne rPSGL-Ig (Gruppe 2C). Es waren wesentlich mehr doppelmarkierte Zellen (TCR / MHC Klasse II) nachweisbar. In den nahezu vollständig chronisch abgestoßenen Transplantaten ohne rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 2C) fand insgesamt, wie in der morphologischen Analyse gesehen wurde, eine zunehmende Zellverarmung statt. Interessanterweise fand sich dennoch zu diesem Zeitpunkt (200 Tage) immer noch eine deutliche Anzahl an T-Zellen, die ihren Rezeptoren (TCR) exprimierten. Dieses Infiltrat fand sich teils flächenhaft und deutet auf eine intensiv nachhaltige Signalbindung zwischen T-Zellen und APC hin (vgl. Abb. 4.1.4.2.1: TCR / MHC Klasse II und Tab. 4.1.4.2.2).

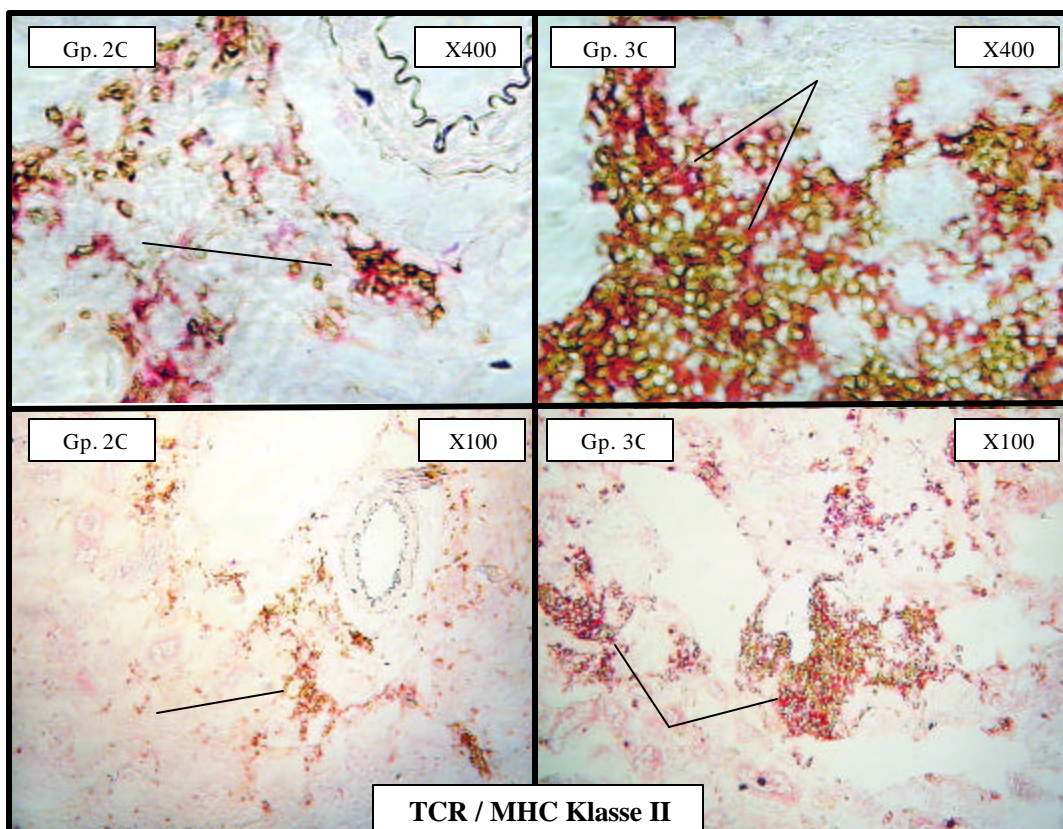


Abb. 4.1.4.2.1 (TCR / MHC Klasse II). Signalübertragung zwischen T-Zellen und APC in Nierentransplantaten aus Tieren ohne (Gruppe 2C) und mit rPSGL-Ig Behandlung (Gruppe 3C) 200 Tage nach Transplantation. Doppelfärbung mit Markierung des T-Zellrezeptors (TCR) und des MHC Klasse II Komplexes (Signal 1). Sektionen sind repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe. Vergrößerung x100 und x400.

In den unbehandelten Tieren der Gruppe 2C war die Anzahl an CD4 (T-Helferzellen) und CD8 T-Zellen (zytotoxische T-Zellen / T-Suppressorzellen) stärker vorhanden als in der mit rPSGL-Ig behandelten Gruppe 3C (vgl. Abb. 9.1.1: CD4 / CD8 und Tab. 4.1.4.2.2). Die T-Helferzellen (CD4) in Tieren, die rPSGL-Ig erhielten (Gruppe 3C), waren jedoch in einem deutlich aktivierteren Zustand (CD25, CD45RC), als in Transplantaten der unbehandelten Gruppe 2C (vgl. Abb. 4.1.4.2.2: CD4 / CD25 und Abb. 9.1.2: CD4 / CD45RC und Tab. 4.1.4.2.2).

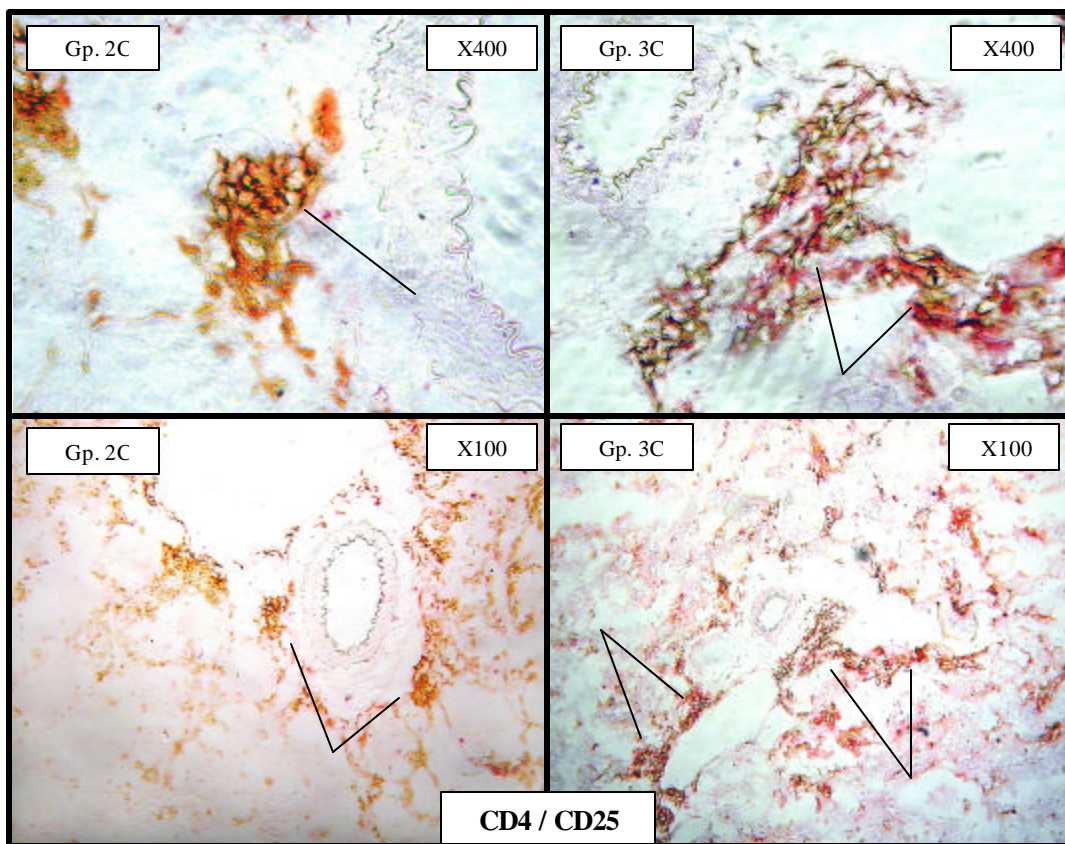


Abb. 4.1.4.2.2 Aktivierung der T-Helferzellen (CD4 / CD25) in Transplantaten aus Tieren ohne (Gruppe 2C) und mit rPSGL-Ig Behandlung (Gruppe 3C) 200 Tage nach Transplantation, dargestellt in der Doppelfärbung. Sektionen sind repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe. Vergrößerung x100 und x400.

Dies galt in dieser Gruppe mit rPSGL-Ig (3C) ebenso für zytotoxische T-Zellen, als auch für T-Suppressorzellen (CD8), deren Aktivierungszustände (CD25) ausgeprägter waren, aber für CD45RC nicht beobachtet wurde (vgl. Abb. 9.1.3: CD8 / CD25 und Tab. 4.1.4.2.2).

Sowohl B7-1 als auch B7-2 sind in der Lage das CD28- und CTLA-4-Oberflächenmolekül zu binden. CD28 scheint eine Rolle bei der Aktivierung der T-

Zellen zu spielen, während vermutlich CTLA-4 eine Funktion als inhibitorischer Rezeptor für die Herunterregulierung der Immunantwort besitzt. Darüber hinaus beeinflusst CD28 möglicherweise auch die Differenzierung von Th-Zellen. CTLA-4 soll zudem eine Rolle bei der T-Zelltoleranz spielen. Die Doppelfärbung mit einem anti-B7-1- oder -B7-2- und einem anti-CD28-Antikörper zeigte sowohl in unbehandelten Transplantaten (Gruppe 2C) als auch nach rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 3C) eine nachweisbare costimulatorische Signalbindung (Signal 2). Während die Bindung zwischen B7-1 und CD28 in beiden Gruppen schwach nachweisbar war (in Abb. 4.1.4.2.3 nicht dargestellt), fand sich für B7-2 und CD28 in Organen behandelter Tiere (Gruppe 3C) eine deutliche Inhibition des 2. Signals. Letzteres könnte auf eine Bedeutung des B7-2-Moleküls im Langzeitverlauf für die chronische Abstoßung hinweisen. In nicht behandelten Tieren war dieses Signal wesentlich deutlicher ausgeprägt (Gruppe 2C) (vgl. Abb. 4.1.4.2.3: B7-2 / CD28 und Tab. 4.1.4.2.2).

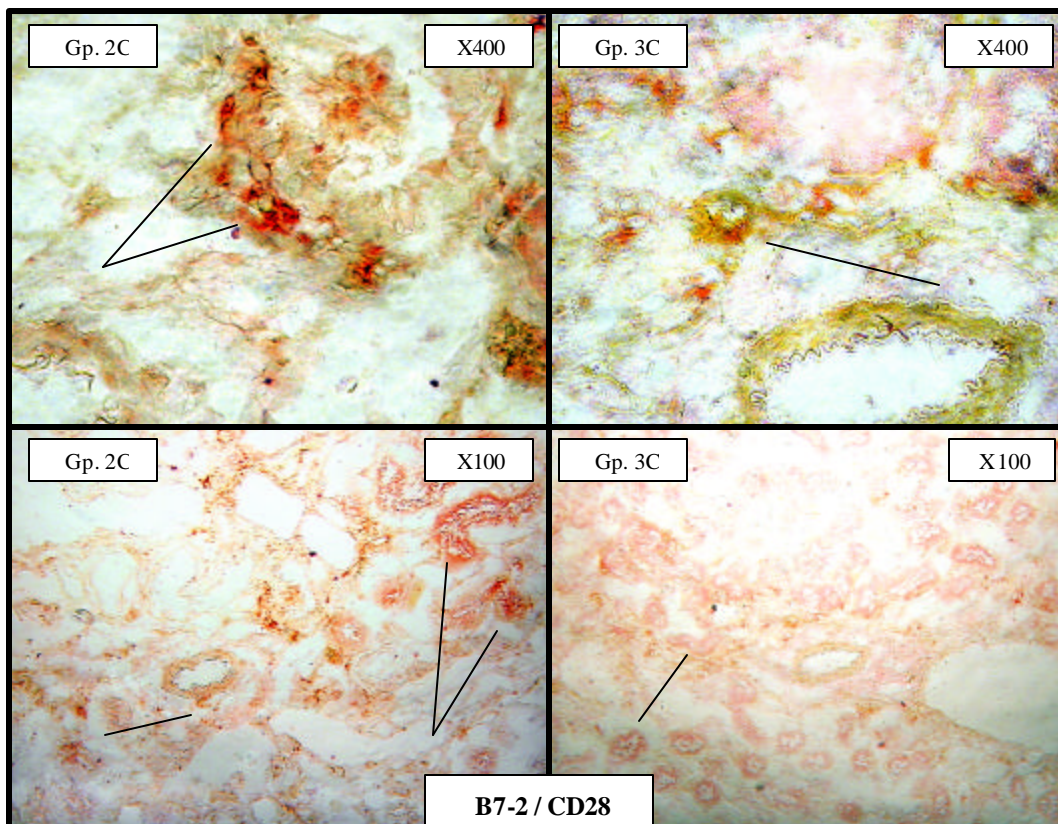


Abb. 4.1.4.2.3 Costimulatorische Signalbindung zwischen B7-2 und CD28 (Signal 2) in Transplantaten aus Tieren ohne (Gruppe 2C) und mit rPSGL-Ig Behandlung (Gruppe 3C) 200 Tage nach Transplantation, dargestellt in der Doppelfärbung. Sektionen sind repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe. Vergrößerung x100 und x400.

In mit rPSGL-Ig behandelten Tieren (Gruppe 3C) war das 2. Signal (B7-1 / und B7-2 / CTLA-4) im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe 2C deutlich nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten auf ein inhibitorisches Signal hin (vgl. Tab. 4.1.4.2.2).

Aktiviert T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche das CD28-Molekül. Um näher analysieren zu können, mit welchen Anteilen diese aktivierte n T-Zellen in den Organen vorzufinden waren, wurde zunächst eine Doppelfärbung mit CD28 und CTLA-4 durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der Anteil aktivierter CD4 T-Zellen (CTLA-4 / CD4) in der Behandlungsgruppe 3C wesentlich erhöht, hingegen in Gruppe 2C (ohne rPSGL-Ig-Behandlung) nicht nachweisbar waren (vgl. Abb. 4.1.4.2.4: CTLA-4 / CD28 und CTLA-4 / CD4 sowie Tab. 4.1.4.2.2). Da sowohl CD4+CD25+ als auch CD4+CTLA-4-Zellen zusammen mit dem Signal B7-1 / B7-2 und CTLA-4 in den mit rPSGL-Ig behandelten Tieren deutlicher exprimiert waren, lässt dies Rückschlüsse auf das Vorhandensein von T-Zellen mit regulatorischen Funktionen zu. rPSGL-Ig scheint daher protektiv auf diese Zellen zu wirken und die Funktion dieser Zellen günstig zu beeinflussen. Funktionell waren die Proteinuriewerte der mit rPSGL-Ig behandelten Tiere (Gruppe 3C) mit denen der syngenen Kontrolle vergleichbar und zeigten langfristig eine stabile Nierenfunktion auf (vgl. Abb. 4.1.2.1 und Abb. 4.1.4.1).

Im Gegensatz dazu fanden sich in unbehandelten Tieren (Gruppe 2C) deutlich mehr aktivierte CD8 T-Zellen (zytotoxische T-Zellen, CTLA-4 / CD8) als in behandelten Empfängern der Gruppe 3C mit rPSGL-Ig (vgl. Abb. 9.1.4: CTLA-4 / CD8 und Tab. 4.1.4.2.2). Dies scheint auf das Vorhandensein von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen in Transplantaten unbehandelter Empfänger von Nieren aus hirntoten Spendern (Gruppe 2C) hinzudeuten.

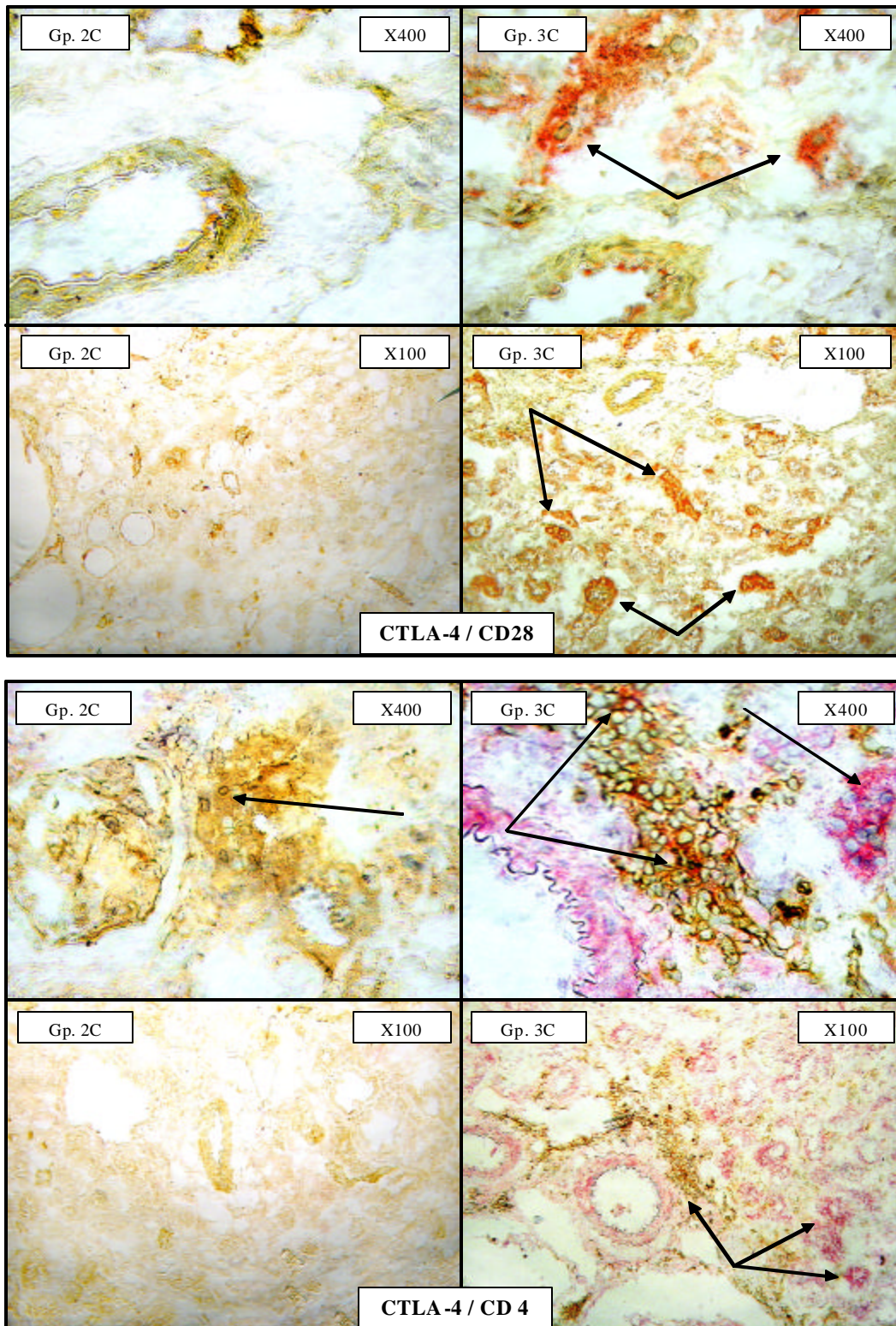


Abb. 4.1.4.2.4 Anteil aktivierter CD4 T-Zellen (CTLA-4), die auf ihrer Oberfläche das CD28-Molekül exprimieren, dargestellt in der Doppelfärbung in Transplantaten aus Tieren ohne (Gruppe 2C) und mit rPSGL-Ig Behandlung (Gruppe 3C) 200 Tage nach Transplantation. Sektionen sind repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe. Vergrößerung x100 und x400.

Der Aktivierungszustand Antigen präsentierender Zellen (APC) wurde mittels zweier Doppelmarkierungen (B7-1 / ED-1 und B7-2 / ED-1) näher analysiert. Es zeigte sich, dass in Transplantaten mit rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 3) weniger doppelt positive Zellen vorhanden waren, als in der Kontrollgruppe ohne rPSGL-Ig-Behandlung (vgl. Abb. 9.1.5: B7-1 / ED-1 und B7-2 / ED-1 und Tab. 4.1.4.2.2). Daher ist zu vermuten, dass das 2. Signal, das für eine weitgehende Zerstörung der Transplantate in Gruppe 2C mit verantwortlich war, in Gruppe 3 nicht eingeschaltet wurde, da rPSGL-Ig eine weitreichende langfristige Abstoßung dieser Transplantate verhinderte. Dies korreliert wiederum mit den Ergebnissen der Proteinurien dieser Gruppe (Gruppe 3C), die während der Gesamtbeobachtung (200 Tage) über Basalwerte nicht hinausgingen und eine stabile Nierenfunktion aufwiesen (vgl. Abb. 4.1.2.1 und Abb. 4.1.4.1). Die Ergebnisse der oben genannten Doppelfärbung zwischen den Gruppen 2A, 3A, 2B und 3B ergaben keine nennenswerte Unterschiede (vgl. Tab. 4.1.4.2.2).

Um die Effektivität von rPSGL-Ig zu überprüfen, wurde sowohl die Expression der einzelnen Selektine (P-, E-, L-Selektin), sowie auch des Liganden (PSGL-1) näher analysiert. Dabei zeigte sich 6 Std. nach Induktion des Hirntodes in den Spenderorganen der Gruppe 3A mit rPSGL-Ig-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle ohne dessen Verabreichung (Gruppe 2A) eine sehr geringe Expression des PSGL-1-Liganden. Ein ganz ausgeprägter Unterschied zeigte sich 3 Tage nach der Transplantation. Während PSGL-1 nur vereinzelt in Nierentransplantaten mit rPSGL-Ig-Behandlung exprimiert wurde (Gruppe 3B), war dieser in der unbehandelten Kontrollgruppe (Gruppe 2B) stark ange färbt (vgl. Abb. 4.1.4.2.5 und Tab. 4.1.4.2.2).

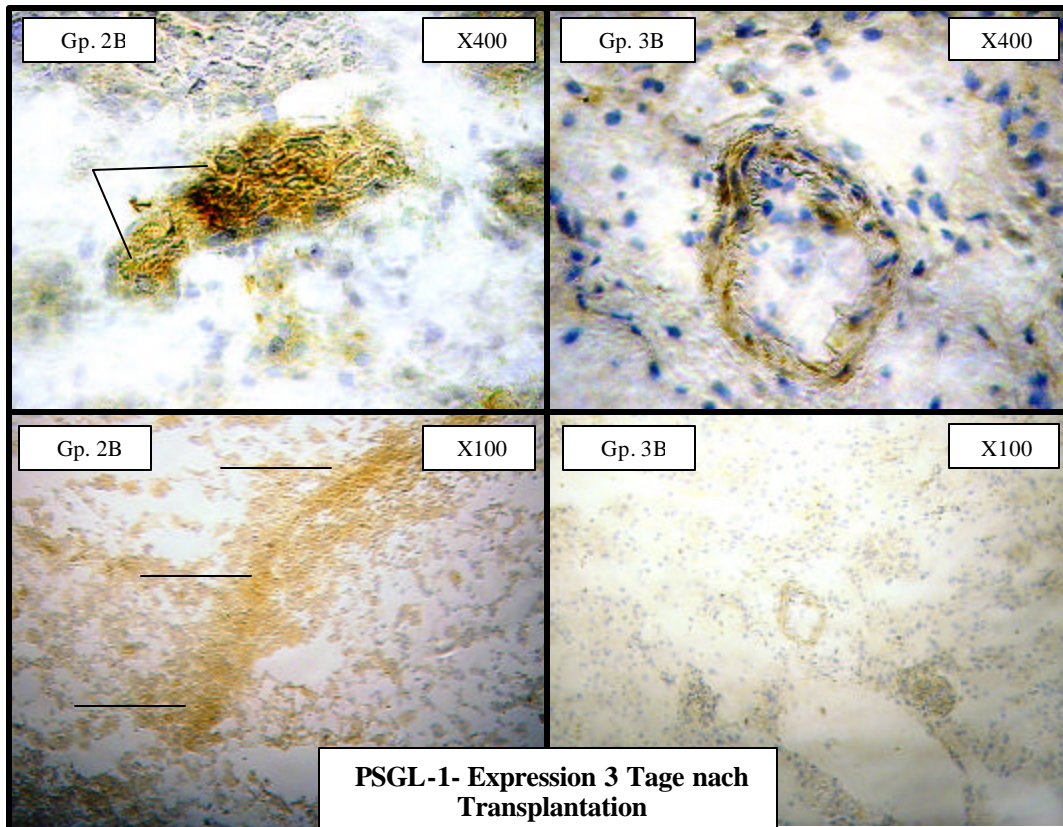


Abb. 4.1.4.2.5 Expression des PSGL-1-Liganden in Nieren aus Empfängern hirntoter Spenderorgane 3 Tage nach Transplantation ohne bzw. mit rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 2B vs. Gruppe 3B). Sektionen sind repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe. Vergrößerung x100 und x400.

Dieser Effekt war auch noch nach 200 Tagen in den mit rPSGL-Ig behandelten Tieren deutlich sichtbar verglichen mit Transplantaten ohne rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 2C vs. Gruppe 3C) (vgl. Abb. 4.1.4.2.6 und Tab. 4.1.4.2.2).

Obwohl PSGL-1 mit allen drei Selektinen (P-, E- und L-Selektin) interagiert, besitzt rPSGL-Ig die höchste Affinität zu P-Selektin, hingegen zu L-Selektin die geringste (93). Daher ist die alleinige Interaktion von P-Selektin mit PSGL-1 ausreichend, um das Phänomen des Rollens und Anheftens von Leukozyten am Gefäßendothel zu ermöglichen (vgl. Abb. 1). Wie in den Transplantaten der Gruppen 2A bis 3C zu beobachten war, scheint die rPSGL-Ig-Behandlung keine Auswirkung auf das Ausmaß der Expression von P-Selektin zu haben (vgl. Tab. 4.1.4.2.2). So ist der Effekt von rPSGL-Ig mehr in einer Blockade, als in einer Suppression von P-Selektin zu sehen. Dies resultiert, wie histologisch gesehen, in einer verminderten Zellinfiltration der vorgeschädigten Transplantate (vgl. Abb. 4.1.4.1). Somit zeigt sich schon 3 Tage nach

Transplantation in Tieren mit rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 3B) eine deutlich verminderte Expression von PSGL-1 (vgl. Tab. 4.1.4. 2.2 und Abb. 4. 1.4.2.5, Gruppe 2B vs. 3B).

Die Ergebnisse der Einzelfärbung mit E- und L-Selektin zwischen den Gruppen 2A, 3A, 2B, 3B, sowie 2C und 3C, ergaben keine nennenswerte Unterschiede (vgl. Tab. 4.1.4.2.2).

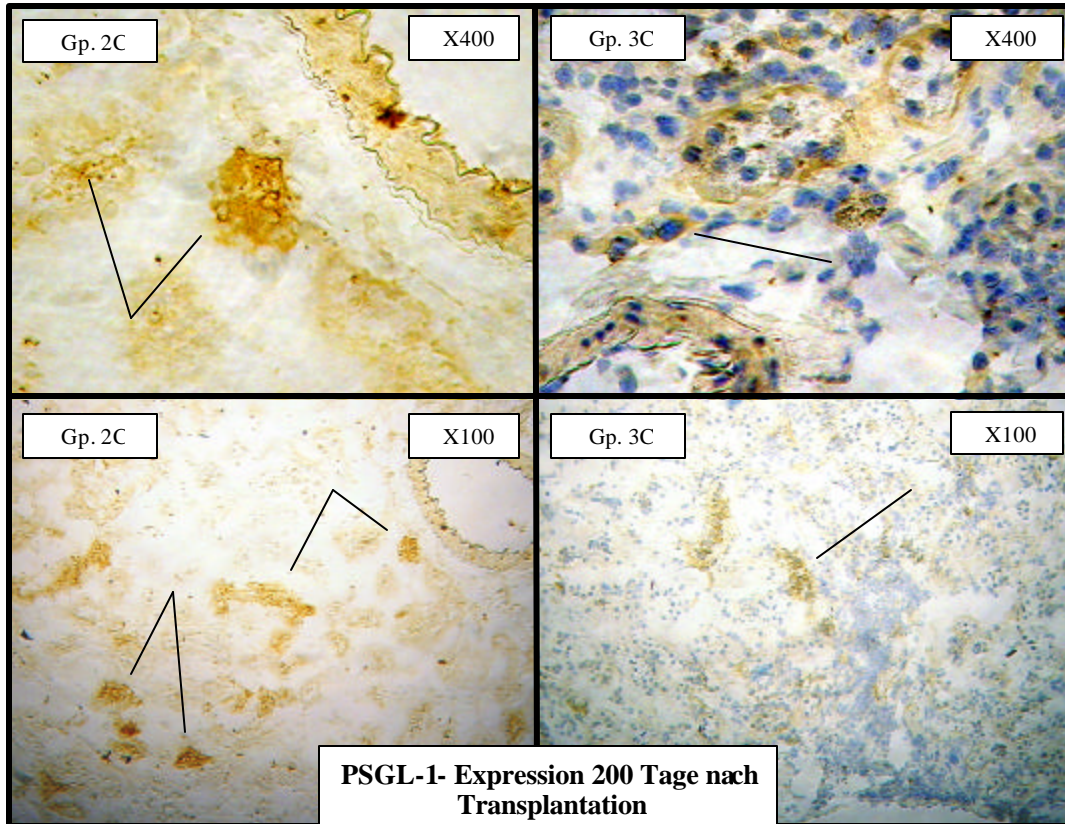


Abb. 4.1.4.2.6 Expression des PSGL-1-Liganden in Nieren aus Empfängern hirntoter Spenderorgane 200 Tage nach Transplantation ohne bzw. mit rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 2C vs. Gruppe 3C) Sektionen sind repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe. Vergrößerung x100 und x400.

4.2 Sirolimus-Versuch

Wie einleitend erwähnt, erfordern allogene Transplantationen generell eine Immunsuppression, die eine erfolgreiche Aktivierung des Immunsystems (Aktivierung von T-Zellen) verhindert. Calcineurin-Inhibitoren wie CsA sind nach wie vor das Mittel der Wahl. Jedoch ist diese Therapie mit vielen Nebenwirkungen behaftet (vgl. S.9). Heutzutage wird, um die toxischen Effekte von CsA zu minimieren, die Dosis dieser Substanz reduziert und diese dafür mit einem weiteren Immunsuppressivum kombiniert. Während CsA die Produktion von T-Zellzytokinen hemmt, verhindert Sirolimus durch Blockade des IL-2-Rezeptors die Antwort dieser T-Zellen. In diesem Versuchsaufbau wurde sowohl die beste Kombination von CsA plus Sirolimus auf ihre maximale Wirksamkeit, als auch auf die Reduktion ihrer Nebeneffekte auf die Niere untersucht, um ein langfristiges Transplantatüberleben ohne Zeichen chronischer Nephropathie zu ermöglichen. Dies wurde wie im vorangegangenen Versuchsaufbau an Transplantaten aus hirntoten Spendern untersucht. Hierzu wurde eine neue multimodale Strategie mit rPSGL-Ig (vgl. S. 10), um erste inflammatorische Veränderungen die durch die Auswirkung des Hirntodes entstehen, zu inhibieren. Dieses wurde in Kombination mit Sirolimus und CsA getestet. Da der Hirntod strukturelle und physiologische Störungen verursacht, die während oder nach der zentralen Schädigung in dem zu transplantierenden Organ auftreten können, wurde die Austestung der Sirolimus-Dosis primär an Lebendspendern vergleichend untersucht.

4.2.1 Überlebensdaten

Außer den Tieren der Gruppe 6C mit Nieren aus hirntoten Spendern und erhöhtem Dosierungsprotokoll von Sirolimus mit CsA im Empfänger (Sirolimus 0,4 mg/kg/21 Tage plus CsA 1,0 mg/kg/10 Tage) und rPSGL-Ig-Behandlung überlebten die Empfänger aller Gruppen in der 150-tägigen Nachbeobachtungszeit. Diese Tiere zeigten ein reduziertes mittleres Überleben als Folge des Versagens des Nierentransplantates von 73.2 ± 26.3 Tagen auf ($p < 0.0001$).

4.2.2 Nierenfunktion

Syngene Kontrolltiere der Gruppe 4 entwickelten in keinem Fall eine Proteinurie. Die Tiere, denen Transplantate aus Lebendspendern transplantiert wurden, zeigten

differierende Dysfunktionsraten auf: Diejenigen Tiere, die mit einer erhöhten Dosis Sirolimus alleine (Gruppe 5B) oder mit einer niedrigen Dosis Sirolimus plus CsA (Gruppe 5D) behandelt worden waren, entwickelten nach 90 Tagen eine geringfügige Proteinurie. Die Proteinurie aus Tieren der Gruppe 5B mit Sirolimus-Monotherapie und 5D mit niedrig dosierter Kombinations-Behandlung waren nach 150 Tagen vergleichbar mit denen der Tiere, die mit dem Standardprotokoll (Gruppe 5A, CsA 1,5mg/kg/10Tage, Daten nicht aufgezeigt) behandelt worden waren. Bei den Tieren der Gruppe 5C, die mit einer Kombination aus höher dosiertem Sirolimus plus CsA behandelt worden waren, zeigte sich vergleichend mit der syngeneten Kontrolle (Gruppe 4) eine deutlich erhöhte Proteinurie (Gruppe 5C: 72,7 mg / 24 Std. und 4: 10,4 mg / 24 Std. 150 Tage nach Tx) (vgl. Abb. 4.2.2.1).

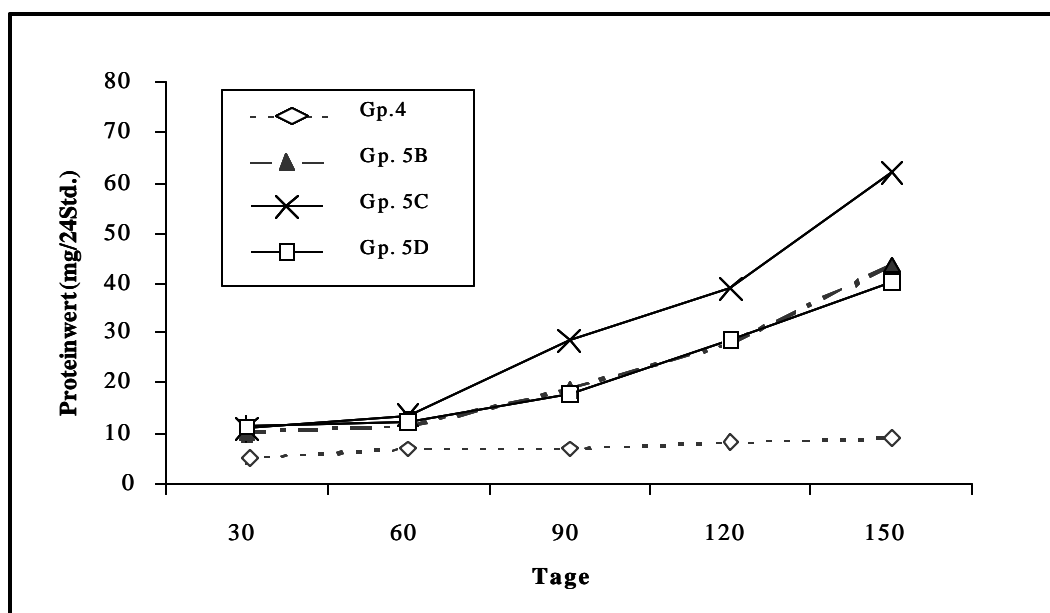


Abb. 4.2.2.1 Proteinuriewerte von Tieren mit Lebendspenderorganen (Gruppe 4, 5B-5D). Empfängern mit höher dosierter Gabe von Sirolimus plus CsA (Gruppe 5C) entwickelten im Vergleich zur syngeneten Kontrolle Gruppe 4 eine signifikant erhöhte Proteinurie. Gp, Gruppe.

Höher dosiertes Sirolimus allein verabreicht (0,4 mg/kg 21 Tage lang, Gruppe 6A), oder insbesondere in Kombination mit CsA, selbst in geringer Dosis (1 mg/kg 10 Tage lang, Gruppe 5C), schwächte die Nierenfunktion langfristig dramatisch und erzeugte progressive chronische morphologische Veränderungen, vor allem, wenn das Nierentransplantat aus hirntoten Spendern stammte (Gruppe 6E, Daten nicht aufgezeigt). Langfristig war der Proteinverlust bei den Empfängern von Transplantaten aus hirntoten Spendern (Gruppe 6B: 58,5 mg / 24 Std. und 6C: 161,5 mg / 24 Std. 150

Tage bzw. 73.2 ± 26.3 Tage nach Transplantation (Tx)) im Vergleich zu den Lebendspendern ausgeprägter (Gruppe 5B: 43,1 mg / 24 Std. und 5D: 40,3 mg / 24 Std. 150 Tage nach Tx). Die initiale Behandlung des hirntoten Spenders und des Empfängers mit je einer Einzeldosis rPSGL-Ig verbesserte das Gesamterscheinungsbild der Transplantate bis zum Beobachtungsende in allen Gruppen (Gruppe 6B und 6D), außer bei den Tieren der Gruppe 6C, die über 21 Tage eine erhöhte Dosis Sirolimus (0,4mg/kg) plus CsA und rPSGL-Ig erhielten (Gruppe 6B: 58,5 mg / 24 Std. und 6D: 38,5 mg / 24 Std. 150 Tage nach Tx vs. Gruppe 6C: 161,5 mg / 24 Std. nach $73,2 \pm 26,3$ Tage nach Tx). Bei den Tieren der Gruppe 6A ohne rPSGL-Ig ($p < 0,0001$, Daten der Gruppe 6A nicht aufgezeigt) reduzierte sich die Proteinurie im Vergleich zu den Tieren der Gruppe 6B, die mit einer erhöhten Dosis Sirolimus und rPSGL-Ig behandelt worden waren (Gruppe 6A: 131,8 mg / 24 Std vs. 6B: 58,5 mg / 24 Std. 150 Tage nach Tx). Die Empfänger der Gruppe 6D, die mit einer verzögerten Niedrigdosis Sirolimus (0,1mg/kg, 4.-13.Tag post-Tx), CsA und rPSGL-Ig behandelt worden waren, wiesen die besten funktionellen Ergebnisse auf, vergleichbar in ihrem Verlauf mit denen der syngenen Kontrollen(Gruppe 4) (Gruppe 6D: 38,5 mg / 24 Std. vs. Gruppe 4: 10,4 mg / 24 Std. nach 150 Tage nach Tx) (vgl. Abb. 4.2.2.2).

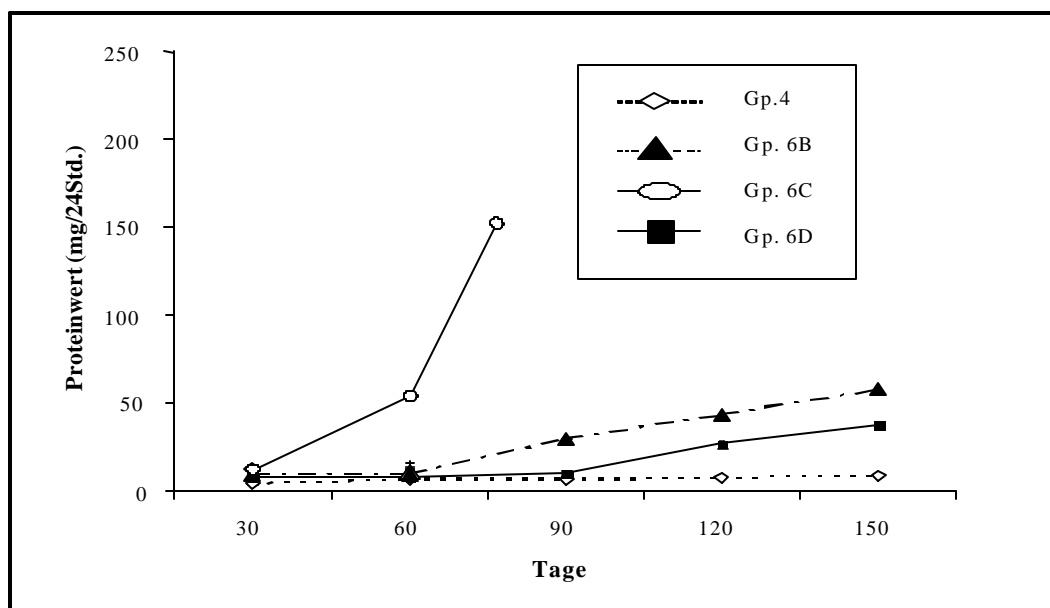


Abb. 4.2.2.2 Proteinuriewerte von Tieren mit Transplantaten aus hirntoten Spendern (Gruppe 6B-6D). Es zeigen sich deutlich erhöhte Proteinuriewerte bei Empfängern mit Transplantaten aus hirntoten Spendern (Gruppe 6C) im Vergleich zu Lebendspenderempfängern (vgl. Abb. 4.2.2.1). Die funktionell besten Ergebnisse wiesen die Tiere mit einer verzögerten Niedrigdosis von Sirolimus plus CsA und rPSGL-Ig auf (Gruppe 6D). Gp., Gruppe.

Um die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungsformen auf die Nierenfunktion weiter zu unterstreichen, wurden bei den Empfängern der Gruppen 4, 5A-6B und 6D die Serumkreatininwerte am Beobachtungsende (150 Tage), bzw. bei den Empfängern der Gruppen 6C nach $73,2 \pm 26,3$ Tagen, bestimmt. Das Ergebnis entsprach dem Ausmaß der Proteinurie. Die Kreatinine waren bei den Empfängern der Gruppen 5A, 5B und 5D jeweils nicht erhöht (0,7 mg / dl). Bei der Gruppen 5C und insbesondere der Gruppen 6A und 6C von Tieren mit Nieren aus hirntoten Spendern waren die Werte im Vergleich zu den syngeneten Kontrollen (Gruppe 4) ($p < 0.001$) deutlich erhöht (Gruppe 5C: 1,2 mg / dl, Gruppe 6A: 2,4 mg / dl und Gruppe 6C: 4,2 mg / dl vs. Gruppe 4: 0,5 mg / dl). Bei den Behandlungsgruppen 6B und 6D mit rPSGL-Ig war das Serumkreatinin wie in der syngeneten Kontrolle nicht erhöht (Gruppe 4) (Gruppe 6B: 1,0 mg / dl und Gruppe 6D: 0,9 mg / dl vs. Gruppe 4: 0,5 mg / dl) (Daten des Serumkreatinins nicht aufgezeigt).

4.2.2 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Wie für die Gruppen mit alleiniger CsA-Behandlung (vgl. Punkt 4.1.3) wurden auch die Tiere mit Kombinationstherapie aus Sirolimus plus CsA auf T-Zellen mit regulatorischer Funktion aus den paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten überprüft. Dabei fanden sich in den Tieren mit verzögerter Niedrigdosierung von Sirolimus (Gruppe 6D) im Vergleich zur höher dosierten Gabe des Immunsuppressivums (Gruppe 6C) deutlich mehr CD4+CD25+ T-Zellen (Gruppe 6D: 5,7% vs. Gruppe 6C: 0,4%). Diese Ergebnisse weisen wiederum wie in Tieren mit alleiniger Behandlung von CsA (Standardprotokoll) plus additivem rPSGL-Ig des vorangegangenen Versuchsaufbaus, auf das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen in Tieren mit langfristig funktionell gering beeinflussten Transplantaten (Gruppe 6D) hin (vgl. Abb. 4.2.3).

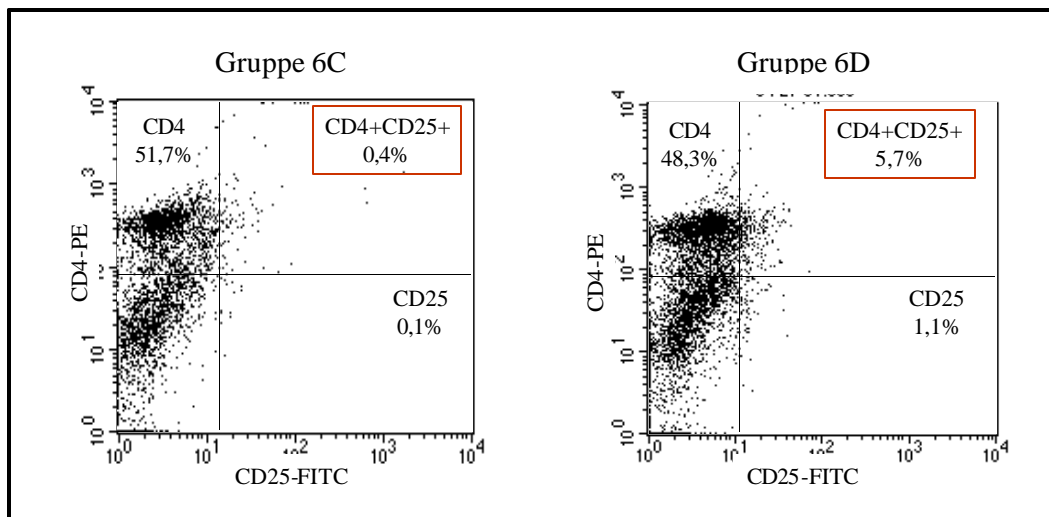


Abb. 4.2.3 Durchflusszytometrische Untersuchung zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+) in den paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten von Tieren mit Nieren aus hirntoten Spendern mit höher dosiertem Behandlungsprotokoll von Sirolimus plus CsA (Gruppe 6C) verglichen mit Zellen aus Tieren mit erniedrigtem Protokoll von Sirolimus (Gruppe 6D). Die Abbildung ist repräsentativ für 8 untersuchte Tiere pro Gruppe 150 Tage post -op. CD4, T-Helferzellen; CD25, aktivierte T-Zellen; PE, Phykoerythrin; FITC, Fluoreszein-Isotiozyanat.

4.2.4 Histologie / Immunhistologie

4.2.4.1 Histomorphologische Ergebnisse

Syngen transplantierte Nieren aus Empfängern der Gruppe 4 blieben im Laufe der 150-tägigen Beobachtungsperiode morphologisch im Wesentlichen normal. Insgesamt fanden sich minimale Veränderungen mit weniger als 10% interstitieller Fibrose und mononuklearen Zellinfiltraten (MNC). Die Empfänger von Transplantaten aus Lebendspendern, die mit dem CsA-Standardprotokoll (1,5mg/kg/10 Tage, Gruppe 5A) bzw. mit Sirolimus alleine (Gruppe 5B) behandelt wurden, zeigten bereits relativ frühe Veränderungen mit Anzeichen einer Glomerulosklerose (>25%), tubulären Atrophie und interstitieller Fibrose. Tiere mit Transplantaten aus Lebendspendern, die eine niedrige Dosis Sirolimus plus CsA (Gruppe 5D) erhielten, zeigten nur fokale MNC und minimale strukturelle Veränderungen in Bezug auf Glomerulosklerose und Arteriosklerose. Im Gegensatz dazu waren in allen Nieren aus Empfängern, die mit einer erhöhten Dosis Sirolimus in Verbindung mit CsA (Gruppe 5C) behandelt wurden intensive chronische Veränderungen mit dichten MNC, einer Glomerulosklerose (GS), interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie zu erkennen. Die Auswirkungen des Spenderhirntodes intensivierten alle Veränderungen. Bei alleiniger Verabreichung von Sirolimus (Gruppe 6A) konnte ein Anstieg der kortikalen interstitiellen Zellinfiltration, der tubulären Atrophie und interstitiellen Fibrose nicht verhindert werden. Ferner fand

sich eine fortgeschrittene GS. Wurde niedrig dosiert CsA zu letzterer Behandlung mit Sirolimus hinzugefügt (Gruppe 6C), intensivierte sich der Prozess, die Nieren zeigten ein Endstadium chronischer Transplantatnephropathie. Die Hinzugabe von rPSGL-Ig zur konventionellen Immunsuppression in Empfänger mit Nieren aus hirntoten Spendern verbesserte das morphologische Bild wesentlich, jedoch mit Ausnahme der Tiere der Gruppe 6C, die mit einer erhöhten Dosis Sirolimus plus CsA behandelt wurden. Diese Tiere wiesen Zeichen schwerer chronischer Abstoßung auf. Wurde rPSGL-Ig nur mit Sirolimus kombiniert, verringerten sich die inflammatorischen Veränderungen deutlich (Gruppe 6B vs. 6A). In der optimalen Behandlungsgruppe 6D mit einer verzögerten Niedrigdosierung von Sirolimus (Tag 4-13 nach Tx), CsA und additiv hinzugegebenes rPSGL-Ig verbesserten sich die Transplantate hinsichtlich tubulärer Erhaltung und ausbleibender Fibrose (geringe Zunahme glomerulärer Matrix und glomerulärer Hypertrophie) (histologische Ergebnisse nicht aufgezeigt).

4.2.4.2 Ergebnisse der Immunhistologie

Das Vorgehen für die Beurteilung der immunenzymatischen Doppel- und Einzelfärbung gleicht dem des rPSGL-Ig-Versuchs (vgl. Punkt 4.1.4.2).

Tab. 4.2.4.2.1 Doppel- und Einzelfärbungen des Sirolimus-Versuches. Die relevanten Ergebnisse sind in der Tabelle schattiert und im Text erläutert.

Doppel-färbungen	Ohne Beh. (GpA)	CsA 15mg/kg (Gp5A) (LS)	RAPA 04mg/kg (Gp5B) (LS)	CsA 10mg/kg+ RAPA 04mg/kg (Gp5C) (LS)	CsA 10mg/kg+ RAPA 04mg/kg (Gp5C) (LS)	RAPA 04mg/kg (Gp6A) (HT)	RAPA 04mg/kg+ rPSGL-Ig (Gp6B) (HT)	CsA 10mg/kg+ RAPA 04mg/kg+ rPSGL-Ig (Gp6C) (HT)	CsA 10mg/kg+ RAPA 04mg/kg+ rPSGL-Ig (Gp6D) (HT)
TCR/MHC Klasse II	+	++	++	+++	++	+(+)	+	+	(+)
CD4/CD8	+	++	++	+++	+++	++(+)	++	++	(+)
CD4/CD25	+(+)	+(+)	+(+)	++(+)	+++	+	+	+(+)	+
CD4RC/CD25	-	-	+	+(+)	++	(+)	(+)	-	+
CD8/CD25	+	(+)	(+)	+++	++	+	+	(+)	(+)
B7-1/CTLA-4	-	+	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	+(+)
B7-2/CTLA-4	-	(+)	(+)	+(+)	+(+)	(+)	+	(+)	++
B7-1/CD28	-	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	(+)	-
B7-2/CD28	-	+	(+)	++	(+)	+	+	+(+)	(+)
CTLA-4/CD28	-	(+)	+	+(+)	+(+)	+(+)	++	++(+)	(+)
CTLA-4/BD-1	(+)	(+)	++	+(+)	+(+)	+	+(+)	++(+)	+
Einzelfärbungen									
P-Selektin	++	+++	++++	+++	+++	+++(+)	+++	+++	+(+)
E-Selektin	++++	++++	++	+++	+++	+++	+++	+++	(+)
L-Selektin	+	+++	+(+)	+++	+++	+++(+)	+++	+++	(+)
PSGL-1	++	++++	+(+)	+++	++(+)	+++	++(+)	+++	(+)

Der jeweils erst genannte AK der Doppelfärbungskombination ist mit HRP- (bräunlicher Farbton), der zweit genannte mit AP (roter Farbton) konjugiert. Das Ergebnis oberhalb der Klammer gibt Auskunft über das Ausmaß der Kolokolisation und Zell-Interaktion der Doppelmarkierung. Das Ergebnis unterhalb (in Klammern) gibt die Intensität der jeweiligen Einzelfärbungen in der Doppelmarkierung wieder, die mit einem Querbalken (/) voneinander abgegrenzt sind. Die Einzelfärbungen (P-, E-, L-, Selektin und PSGL-1) sind ausschließlich HRP konjugiert. AP, alkalische Phosphatase; CD, Differenzierungscluster; HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); HT, Hirntod; CTLA-4, cytotoxic Tlymphocyte-associated protein 4; CsA, Cyclosporin A; RAPA, Sirolimus; LS, Lebendspender; MHC, Major Histokompatibilität Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex); PSGL-1, P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1; TCR, T-cell-receptor (T-Zellrezeptor); Gp., Gruppe.

Im Vorversuch wurde die Zellinteraktion zwischen T-Zellen und APC untersucht (vgl. Punkt 4.1.4.2). In dieser Studie wurde nun zudem der Einfluss von Sirolimus auf die Signalübertragung zwischen T-Zelle und APC anhand der Doppelfärbung analysiert.

Die Expression des ersten Signals (TCR / MHC Klasse II) war in den Tieren mit Nieren hirntoter Spender (Gruppe 6A-6D) mit der in der syngen Kontrolle (Gruppe 4) vergleichbar, in allen Lebendspendertransplantaten (Gruppe 5A-5D) hingegen viel deutlicher exprimiert. Bei alleiniger Sirolimus-Behandlung (0,4 mg/kg) (Gruppe 5B vs. 6A) ergaben sich jedoch keine Unterschiede für dieses Signal zwischen Lebendspendernieren oder Nieren aus hirntoten Spendern (vgl. Abb. 4.2.4.2.1: TCR / MHC Klasse II und Tab. 4.2.4.2.1).

Das zweite Signal (B7-1 / B7-2 mit CD28) war in den syngen Kontrollen (Gruppe 4) nicht exprimiert. In Lebendspendertransplantaten (Gruppe 5A-5D) war dieses zweite Signal generell deutlich schwächer exprimiert als das erste Signal (TCR / MHC Klasse II). Die Subanalyse des Signals B7-1 / B7-2 mit CD28 der Gruppen untereinander ergab in Transplantaten aus Tieren mit niedriger Sirolimus-Gabe (Gruppe 5D), eine sehr schwache B7-2 / CD 28 Expression, die mit der syngen Kontrolle (Gruppe 4) vergleichbar war. Hingegen kam es bei Tieren mit einer erhöhten Dosis von Sirolimus (Gruppe 5C) zu einer deutlichen Expression dieses Signals (vgl. Abb. 9.1.6: B7-2 / CD28 und Tab. 4.2.4.2.1).

Bei Empfängern mit Transplantaten aus hirntoten Spendern zeigte die Doppelfärbung mit einem anti-B7-2 und anti-CD28 Antikörper sowohl bei Transplantaten aus solchen Tieren, die mit einer erhöhten Dosis an Sirolimus (0,4mg/kg / 21 Tage) plus rPSGL-Ig (Gruppe 6C), als auch mit einer verzögerten Niedrigdosierung dieses Immunsuppressivums (0,1mg/kg) plus rPSGL-Ig (Gruppe 6D) behandelt wurden, eine nachweisbare Signalbindung, die jedoch in letzterer Gruppe (Gruppe 6D) deutlich schwächer exprimiert war. Während diese Bindung in dieser Gruppe (Gruppe 6D) schwach nachweisbar war, fand sich hingegen für B7-1 und CD28 in diesen Tieren mit einer verzögerten Niedrigdosis an Sirolimus eine Unterdrückung dieses costimulatorischen Signals. Dieses Phänomen war mit der syngen Kontrolle (Gruppe 4) vergleichbar (vgl. Abb. 4.2.4.2.2: B7-2 / CD28 und Tab. 4.2.4.2.1).

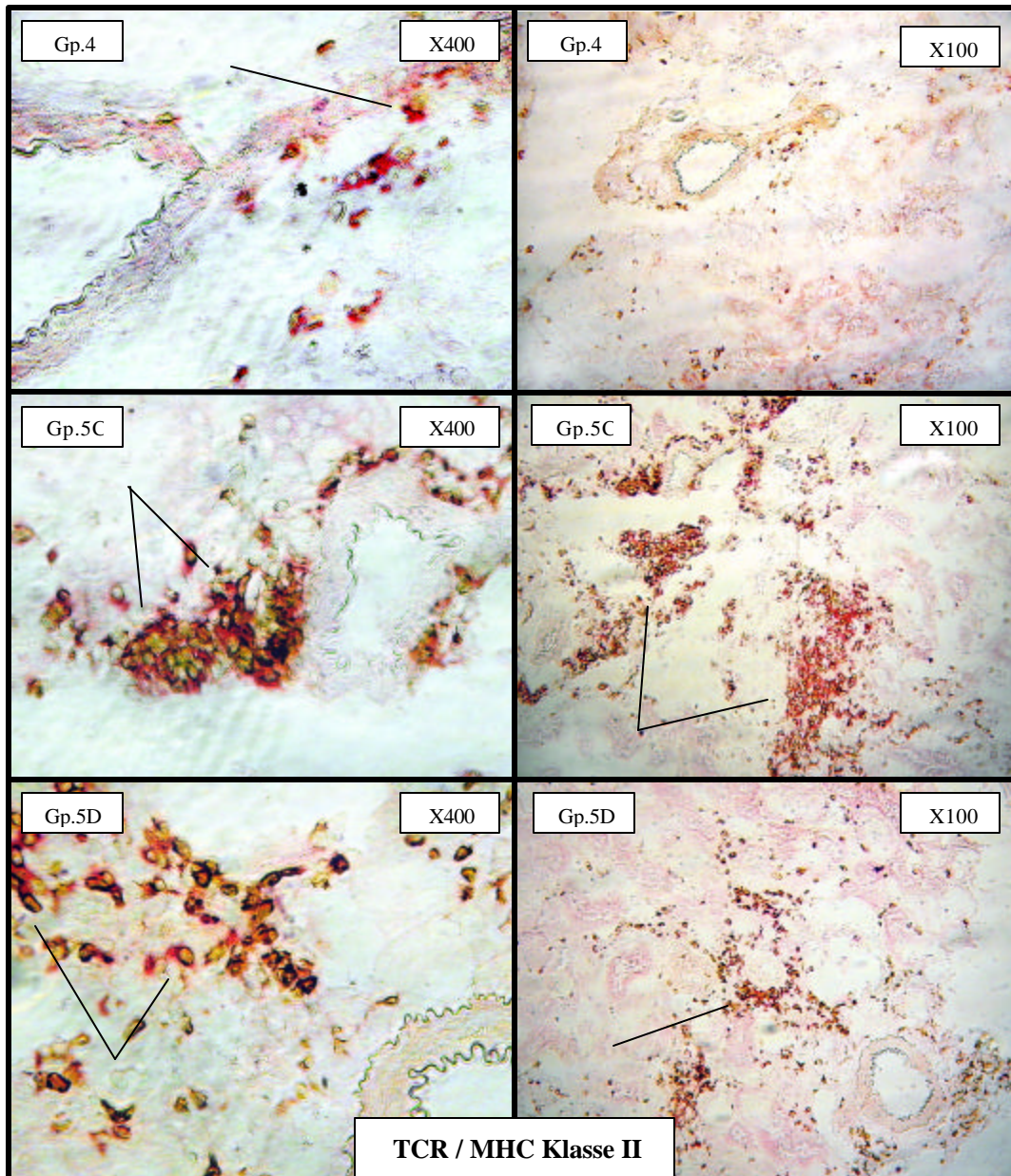


Abb. 4.2.4.2.1 Deutliche Expression des ersten Signals (TCR / MHC Klasse II) zwischen T-Zellen und APC in den Nieren aus Tieren mit Lebendspendertransplantaten der Gruppen 5C und 5D 150 Tage post-op. Doppelfärbung mit Markierung des T-Zellrezeptors (TCR) und des MHC Klasse II Komplexes. Sektionen sind repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe. Vergrößerung x100 und x400.

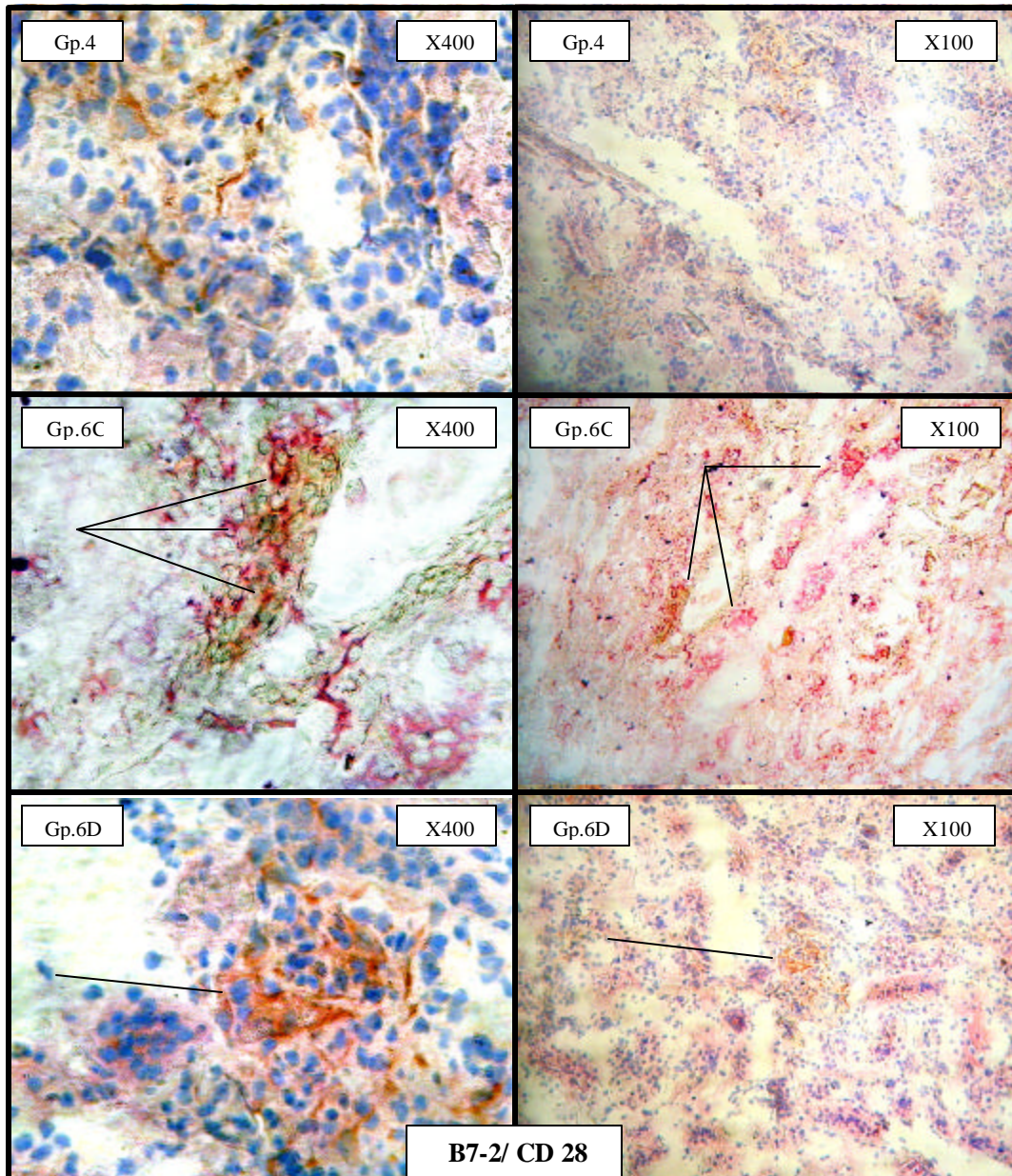


Abb. 4.2.4.2.2 Costimulatorische Signalbindung zwischen B7-2 und CD28 (Signal 2) in den Nieren aus Tieren mit Transplantaten aus hirntoten Spendern der Gruppen 6C und 6D 150 Tage post-op., dargestellt in der Doppelfärbung. Sektionen sind repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe. Vergrößerung x100 und x400.

Der Anteil CD4 / CD8 doppelmarkierter T-Zellen war in Tieren mit rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 6C und 6D) im Vergleich zu Transplantaten ohne dessen Gabe (Gruppe 5C und 5D) reduziert, bei Tieren mit verzögerter Niedrigdosierung von Sirolimus (Gruppe 6D) sogar auf der Basis der syngenen Kontrolle (Gruppe 4). Obwohl mehr CD25+ T-Zellen in Tieren mit einem Niedrigdosis-Protokoll von Sirolimus plus

CsA (Gruppe 6D) im Vergleich zu Tieren mit erhöhtem Dosis-Protokoll (Gruppe 6C) beobachtet wurden, war jedoch die Anzahl der doppelmarkierten CD4+CD25+ T-Zellen zwischen diesen beiden Gruppen vergleichbar (vgl. Tab. 4.2.4.2.1). Hingegen ergab sich für das costimulatorische Signal B7-1 / B7-2 mit CTLA-4 für Gruppe 6D mit einem Niedrigdosis-Protokoll von Sirolimus eine deutliche Expression, in Gruppe 6C dagegen nur ein geringer Nachweis (vgl. Tab. 4.2.4.2.1). Diese Ergebnisse weisen auf T-Zellen mit regulatorischer Funktion hin, die wahrscheinlich die Funktion des Transplantates begünstigt haben. Um zu analysieren, ob T-Zellen (CD4 und CD8) aktiviert waren, wurde eine Doppelmarkierung mittels eines anti-CTLA-4 und anti-CD28 (CTLA-4 / CD 28) Antikörpers überprüft. Hierbei ergab sich für den Anteil doppelmarkierter, aktivierter CD4 / CD8 T-Zellen in Gruppe 6C mit einem erhöhtem Dosis-Protokoll von Sirolimus eine signifikante Erhöhung im Vergleich zum Niedrigdosis-Protokoll in Gruppe 6D, die fast der syngenen Kontrolle glich (Gruppe 4). Diese Gruppe 6D aus verzögerter und niedrig dosierter Gabe an Sirolimus plus CsA und rPSGL-Ig wies morphologisch gut erhaltene und funktionell kaum beeinträchtigte Transplantate auf (vgl. Abb. 9.1.7: CTLA-4 / CD28 und Tab. 4.2.4.2.1).

Das Vorhandensein aktivierter T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen wurde mittels der Doppelmarkierung CTLA-4 / ED-1 näher analysiert. Während die Bindung zwischen CTLA-4 und ED-1 in Transplantaten der Gruppe 6C sehr ausgeprägt war, fand sich in Organen der Gruppe 6D eine deutlich geringere Expression, die mit der syngenen Kontrolle (Gruppe 4) vergleichbar war. Dieses Ergebnis könnte auf den Einfluss der verzögerten und niedrig dosierten Gabe von Sirolimus in Kombination mit rPSGL-Ig zurückzuführen sein. Dies unterbindet eine Kaskade inflammatorischer Prozesse und kann somit wie aufgezeigt eine chronische Abstoßung verhindern (vgl. Abb. 4.2.4.2.3: CTLA-4 / ED-1 und Tab. 4.2.4.2.1).

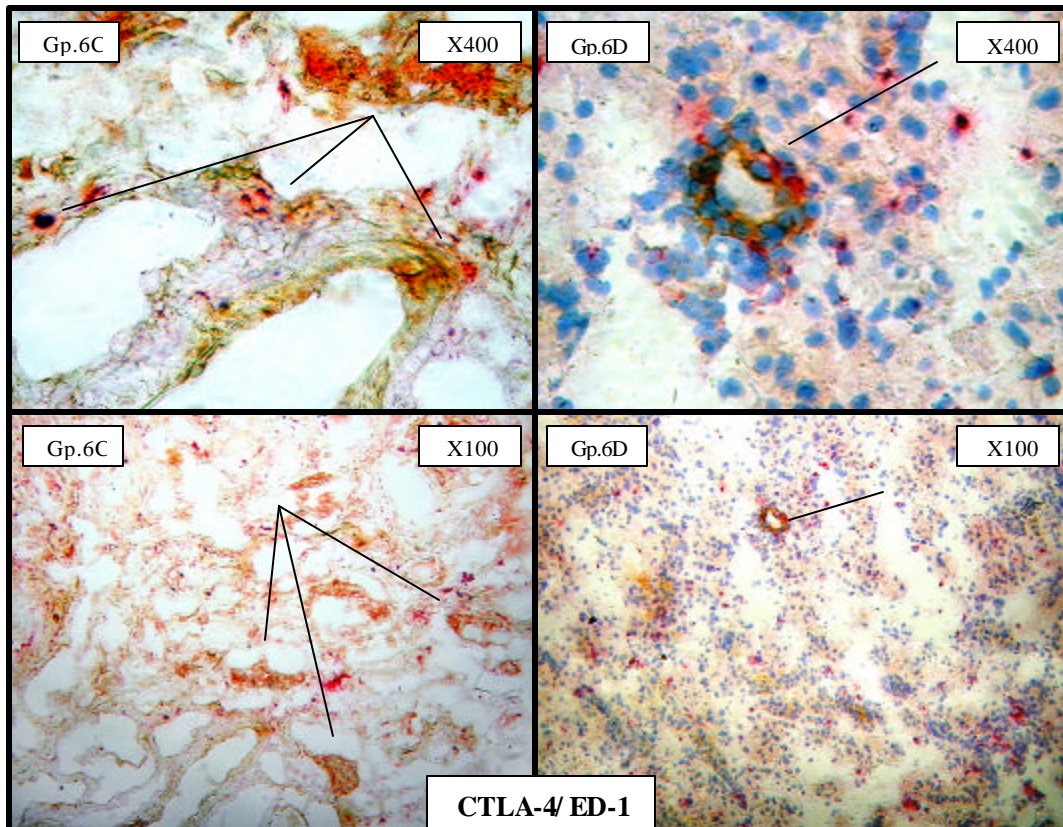


Abb. 4.2.4.2.3 Anteil aktivierter Antigen präsentierender Zellen (CTLA-4 / ED-1), dargestellt in den Nieren aus Tieren mit Transplantaten hirntoter Spender der Gruppen 6C und 6D 150 Tage post-op. Sektionen sind repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe. Vergrößerung x100 und x400.

Um die Wirksamkeit von rPSGL-Ig in Kombination mit Sirolimus zu analysieren, wurde sowohl die Expression der einzelnen Selektine (P-, E-, L-Selektin), sowie auch ihres Liganden PSGL-1 näher untersucht.

Dabei zeigte sich sowohl 3 als auch 150 Tage postoperativ in den Nierentransplantaten eine größtenteils deutliche Expression von P- und E-Selektin im Gruppenvergleich (Gruppe 5A-6C), sowie auch der einzelnen Therapiegruppen mit der syngeneten Kontrolle (Gruppe 4), die bis auf die Gruppe 6D mit einem Niedrigdosis-Protokoll von Sirolimus plus CsA und additivem rPSGL-Ig keinen wesentlichen Unterschied aufwies. Hingegen wurde L-Selektin in Organen aus Tieren der genannten Gruppe (6D) vergleichbar schwach wie in der syngeneten Kontrolle (Gruppe 4) exprimiert. Der Ligand PSGL-1 war in dieser Gruppe (6D) mit einem Niedrigdosis-Protokoll von Sirolimus plus CsA und rPSGL-Ig-Behandlung im Gegensatz zu der relativ starken Expression in den anderen Therapiegruppen (Gruppe 5A-6C) und der syngeneten Kontrolle (Gruppe 4),

kaum (3 Tage post-op.) bzw. moderat (150 Tage post-op.) nachweisbar (vgl. Abb. 4.2.4.2.4: PSGL-1 und Tab. 4.2.4.2.1).

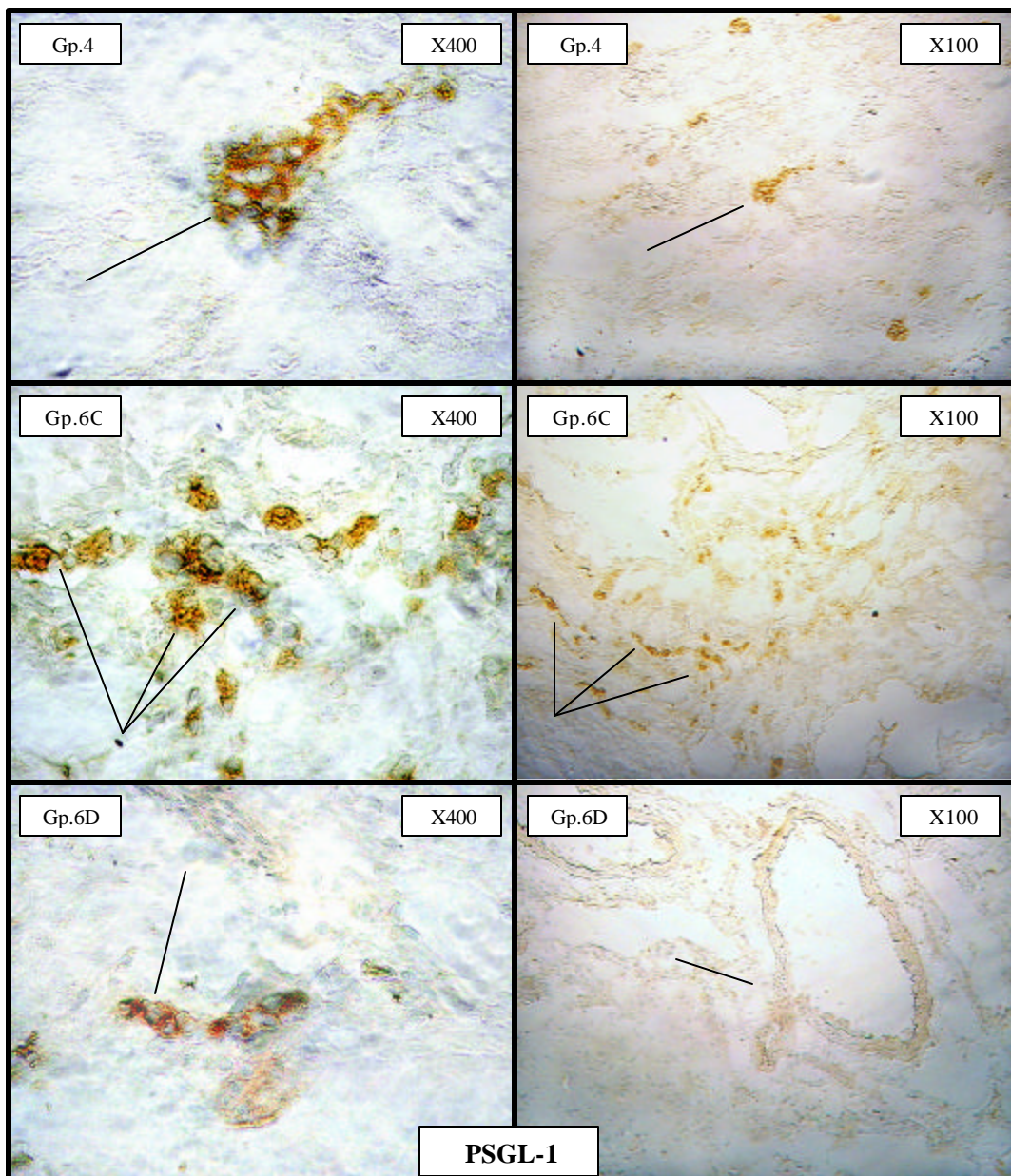


Abb. 4.2.4.2.4 Expression des PSGL-1-Liganden in den Nieren aus Tieren mit Transplantaten hirntoter Spender der Gruppe 6C und 6D mit rPSGL-1g-Behandlung, vergleichend mit der syngenischen Kontrolle (Gruppe 4) 150 Tage post-op. Sektionen sind repräsentativ für 8 Transplantate / Gruppe. Vergrößerung x100 und x400.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Vorversuchs (vgl. Punkt 4.1.4.2 und Abb. 4.1.4.2.7) mit nur alleiniger Gabe von rPSGL-Ig, bei der es zu einer möglichen Blockade ausschließlich von PSGL-1 kam, wurde mit einer niedrig dosierten Gabe von Sirolimus zusammen mit CsA additiver rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 6D) eine Herunterregulierung sowohl von P-, E-, L-Selektin, als auch von PSGL-1 nachgewiesen. Dies untermauert die funktionell und morphologisch gut erhaltenen Transplantateigenschaften (vgl. Punkt 4.2.2 und 4.2.4.1).

4.2.5 RNase-Protektions-Test

Um die relevanten Zytokine, die mit inflammatorischen Prozessen einer chronischen Abstoßung (IL-1 α/β , -2, -6, TNF- α/β und IFN- γ) bzw. langfristigen Akzeptanz (IL-10) einhergehen, zu untersuchen, wurden die Nierentransplantate der behandelten Gruppen mit Hilfe des RNase-Protektions-Test weiter analysiert. Die Zytokine IL-1 β , -2, -6, TNF- α/β und IFN- γ waren unabhängig von der Behandlung der Transplantate in den Gruppe 6B und 6C mit höher dosiertem Protokoll aus Sirolimus allein oder kombiniert mit CsA, die im Zeitverlauf die größten Schädigungen aufwiesen, hoch exprimiert. Diese Zytokine waren in der Gruppe 6D mit der besten Transplantatfunktion, die mit rPSGL-Ig und einem niedrig dosiertem Kombinationsprotokoll aus Sirolimus und CsA behandelt wurden, deutlich herunterreguliert. Im Gegensatz dazu war das Zytokin IL-10 in dieser Gruppe (Gruppe 6D) hochreguliert (vgl. Abb. 4.2.5).

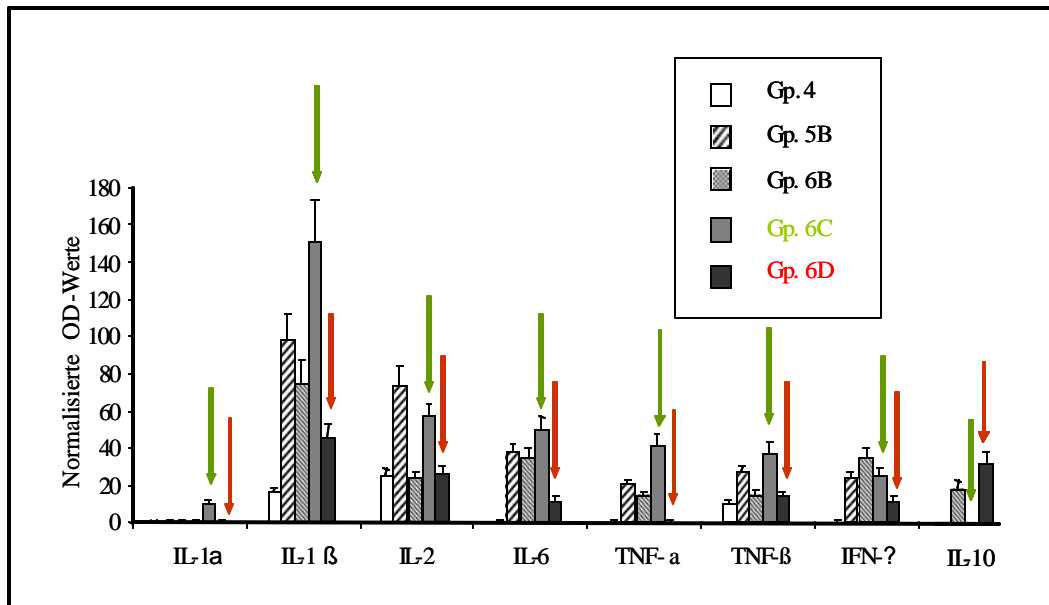


Abb. 4.2.5 Zytokin-Genexpressionen im Nierentransplantat: hochregulierte Genexpression lymphozytärer und Makrophagen-assoziiierter Faktoren in Nieren mit chronischer Abstoßung (Gruppe 6B und 6C, letztere Gruppe mit grüner Markierung). Die Nieren der Gruppe 6D (rote Markierung) waren hingegen nicht signifikant verändert. IL-10, als typisches Zytokin für Th2-Zellen war in der Gruppe 6B, jedoch mehr in der Gruppe 6D exprimiert. IL, Interleukin; TNF- α , Tumornekrosefaktor alpha; TNF- β , Tumornekrosefaktor beta; IFN- γ , Interferon gamma; OD, optische Dichte; Gp., Gruppe.

4.2.6 Real Time Polymerase-Kettenreaktion (Real Time-PCR)

Genexpressionsmuster aus Transplantaten der Gruppen 4, 5C, 5D, 6A-6D wurden in der Real Time-PCR weiter analysiert. Die Ergebnisse aus dem RNase-Protektions-Test wurden in der Real Time-PCR bestätigt. Die Gene der Transplantate der Gruppe 6A, und vor allem der Gruppe 6C, die schwere morphologische Zerstörungen der Transplantate aufwiesen, waren signifikant hochexprimiert. Die Gene IL-1 β , MCP-1, TNF- α und TGF- β in Nierentransplantaten mit einer niedrigen Dosis an Sirolimus und CsA in Kombination mit rPSGL-Ig (Gruppe 6D) glichen den Werten syngener Kontrolltiere (Gruppe 4) (vgl. Abb. 4.2.6).

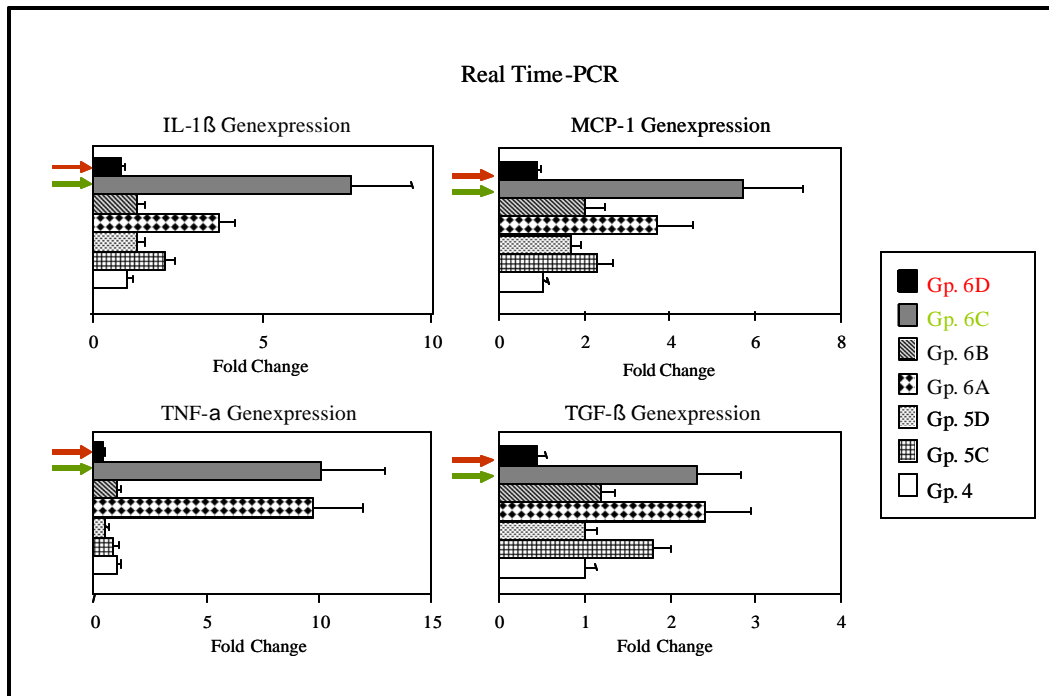


Abb. 4.2.6 Zytokin-Genexpressionen im Nierentransplantat: Genexpressionsmuster repräsentativer Zellprodukte vergleichbar mit dem RNase-Protektions-Test (vgl. Abb. 4.2.5). Es zeigt sich eine hohe Expression in Transplantaten mit schwerer chronischer Abstoßung (Gruppe 6C, grüne Pfeile). Transplantate aus Gruppe 6D (rote Pfeile) sind mit der syngenen Kontrolle vergleichbar. IL, Interleukin; TNF- α , Tumornekrosefaktor alpha; TGF- β , Transforming growth factor- β ; MCP-1, macrophage chemoattractant and activating factor; Gp., Gruppe; Fold Change, 2^{- $\Delta\Delta$ CT}.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.3.1 rPSGL-Ig-Versuch

Der Hirntod wird als einer der bedeutendsten Risikofaktoren sowohl für die frühe, als auch die späte Allotransplantatdysfunktion angesehen. In einem etablierten Rattenmodell der chronischen Abstoßung (F344? LEW) wurde der protektive Einfluß einer rekombinanten löslichen Form von P-Selektin-Glykoprotein-Ligand (rPSGL-Ig) auf die initialen inflammatorischen Prozesse, die durch den Hirntod ausgelöst werden, untersucht. Während Transplantate ohne rPSGL-Ig-Behandlung am 3. Tag nach Transplantation (Gruppe 2B) ein deutliches Infiltrat an Neutrophilen aufwiesen, bewirkte die initiale rPSGL-Ig-Gabe zu diesem frühen Zeitpunkt (Gruppe 3B) neben einem minimalen Tubuluszellschaden eine nur geringe und fokale mononukleare Zellinfiltration. Am Tag 200 wiesen syngene Transplantate eine gewisse glomuläre Hypertrophie auf, waren aber morphologisch insgesamt gut erhalten (Gruppe 1). Unbehandelte Transplantate aus hirntoten Spendern zeigten eine fortgeschrittene globale Schädigung (Gruppe 2C). Die initiale Gabe von rPSGL-Ig wirkte langfristig, die Transplantate wiesen eine fast normale Struktur auf (Gruppe 3C) und waren damit mit der syngeneten Kontrolle (Gruppe 1) vergleichbar. Insgesamt überlebten alle Empfänger der Gruppen 2C und 3C unabhängig von der rPSGL-Ig-Gabe den Beobachtungszeitraum von 200 Tagen. Bei Tieren, die rPSGL-Ig nicht erhielten (Gruppe 2C), kam es jedoch bis zum Beobachtungsende zu einem signifikanten und stark ausgeprägtem Anstieg der Proteinurie- und Serumkreatininwerte. Die Nierenmorphologie dieser Transplantate war weitgehend zerstört. Wie histomorphologisch gesehen, fand in den nahezu vollständig chronisch abgestoßenen Transplantaten ohne rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 2C) insgesamt eine zunehmende Zellverarmung statt. Dennoch fanden sich zu diesem Zeitpunkt (200 Tage nach Transplantation) immer noch eine deutliche Anzahl an T-Zellen (CD4 und CD8), deren Aktivierungszustand (CD25, CD45RC) in der behandelten Gruppe 3C jedoch stärker ausgeprägt war als in der unbehandelten Gruppe 2C. In diesen Transplantaten behandelter Empfänger (Gruppe 3C) waren im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren (Gruppe 2C) viele doppelmarkierte Zellen (TCR / MHC Klasse II, Signal 1) nachweisbar. Dies deutet auf eine nachhaltige Signalbindung zwischen T-Zellen und APC hin, welche hingegen in der unbehandelten Gruppe (Gruppe 2C) nur gering, wie in

der syngenen Kontrolle (Gruppe 1), nachweisbar war. T-Zellen benötigen jedoch ein zweites Signal (B7-1 / B7-2 mit CD28 oder CTLA-4), um voll aktiviert zu werden. CD28 scheint eine Rolle bei der Aktivierung dieser T-Zellen zu spielen, während vermutlich CTLA-4 eine Funktion als inhibitorischer Rezeptor für das Herunterregulieren der Immunantwort besitzt. In der mit rPSGL-Ig behandelten Gruppe 3C kam es 200 Tage nach der Transplantation zu einer nachhaltigen Inhibition des 2. costimulatorischen Signals B7-2 / CD28. Hingegen war das 2. Signal B7-1 / B7-2 mit CTLA-4 im Vergleich zur unbehandelten Gruppe 2C deutlich exprimiert. Zudem war der Anteil aktivierter T-Helferzellen (CTLA-4 / CD4) in der mit rPSGL-Ig behandelten Gruppe 3C, im Gegensatz zur Gruppe 2C ohne rPSGL-Ig-Behandlung, deutlich erhöht. In den paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten dieser Tiere war der CD3+CD4+-Anteil an T-Zellen geringer vorhanden, jedoch wurde der Anteil an CD4+CD25+ Zellen deutlicher als in den nicht behandelten Gruppe (Gruppe 2C) nachgewiesen. Letzteres Ergebnis stimmt mit den immunhistologischen Resultaten überein, bei denen CD4+CD25+ und B7-1 / B7-2 mit CTLA-4 deutlich exprimiert waren und auf das Vorhandensein peripher regulatorischer T-Zellen hinweist. Um die Effektivität von rPSGL-Ig zu überprüfen, wurde sowohl die Expression der einzelnen Selektine (P-, E-, L-Selektin), sowie auch des Liganden PSGL-1 analysiert. Dabei zeigte sich 6 Std. nach Induktion des Hirntodes in den Spenderorganen der Gruppe 3A mit rPSGL-Ig-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle ohne rPSGL-Ig-Behandlung der Gruppe 2A eine sehr geringe Expression des PSGL-1-Liganden. Ein ganz ausgeprägter Unterschied ergab sich 3 Tage nach der Transplantation: während PSGL-1 nur vereinzelt in Nierentransplantaten mit rPSGL-Ig-Behandlung exprimiert wurde (Gruppe 3B), war dieser in der unbehandelten Kontrollgruppe (Gruppe 2B) stark angefärbt. Dieser Effekt war auch noch nach 200 Tagen deutlich sichtbar (Gruppe 3C vs. 2C). Die Behandlung mit rPSGL-Ig (Gruppe 3C) scheint daher die Expression von P-Selektin zu blockieren und verhindert damit eine Zelladhäsion. Dies resultiert, wie histologisch gesehen, in einer verminderten Zellinfiltration der vorgeschädigten Transplantate aus hirntoten Spendern. Der PSGL-1-Ligand war in diesen Nierentransplantaten nur vereinzelt exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass rPSGL-Ig die initialen, inflammatorischen Prozesse, die durch den Hirntod verursacht werden und für eine chronische Abstoßung

mitverantwortlich sind, inhibiert. Zudem scheint rPSGL-Ig T-Zellen mit regulatorischer Funktion zu begünstigen, die für die Aufrechterhaltung der Transplantatfunktion eine wichtige Rolle spielen.

4.3.2 Sirolimus-Versuch

Nach wie vor ist CsA für die Transplantation das Immunsuppressivum der Wahl. Von großer klinischer Relevanz ist es, die toxischen Langzeiteffekte der Calcineurin-Inhibitoren, wie CsA, zu reduzieren. Heutzutage wird daher versucht eine niedrige Dosierung der Calcineurin-Inhibitoren in Kombination mit nicht-Calcineurin-Inhibitoren zu verwenden. Dadurch wird sowohl eine maximale Wirksamkeit als auch eine Reduktion ihrer Nebeneffekte erreicht und ein langfristiges Transplantatüberleben ohne Zeichen chronischer Nephropathie ermöglicht. In diesem Versuchsansatz wurde sowohl die beste Kombination von niedrig dosiertem Sirolimus plus CsA auf ihre maximale Wirksamkeit, als auch auf die Reduktion ihrer renalen Nebeneffekte untersucht, um eine chronische Transplantat-Nephropathie zu vermeiden. Wie im Vorversuch demonstriert wurde (S. 17), blockiert rPSGL-Ig die initialen, inflammatorischen Prozesse, die durch den Hirntod verursacht werden und für eine chronische Abstoßung mitverantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue multimodale Strategie aus einer Kombination von Sirolimus und als Basisimmunsuppression CsA sowohl an Nieren aus Lebendspendern als auch an Transplantaten aus hirntoten Spendern mit additivem rPSGL-Ig untersucht. Alle Empfänger der (Gruppe 5A-5D) überlebten die 150tägige Beobachtungszeit. Höher dosiertes Sirolimus (0,4 mg / kg 21 Tage lang) in Kombination mit einer niedrigen Dosis von CsA (Gruppe 5C) schwächt die Nierenfunktion langfristig deutlich. Im Gegensatz zur Kombination von CsA mit einer niedrigen Dosierung von Sirolimus (Gruppe 5D), zeigten diese Tiere mit lebendspender Transplantate eine verbesserte Nierenfunktion und waren mit Tieren, die Sirolimus als Monotherapie erhielten (Gruppe 5B) oder CsA als alleiniges Standardprotokoll in diesem Modell (Gruppe 5A) bekommen, vergleichbar. Trotz der vergleichbaren Proteinuriewerte dieser Tiere (Gruppe 5A, 5B, 5D) fanden sich histo-morphologisch bei Tieren der Gruppe 5A und 5B Anzeichen einer Glomerulosklerose, tubulären Atrophie und interstitieller Fibrose. Hingegen zeigten lebendspender Transplantate mit einer niedrigen Dosierung von Sirolimus plus

CsA (Gruppe 5D) eine nur fokale mononukleare Zellinfiltration und minimale strukturelle Veränderungen in Bezug auf Glomerulosklerose und Arteriosklerose auf. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dieser Kombination aus niedrig dosiertem Sirolimus plus CsA sowohl eine Reduktion der toxischen Nebeneffekte als auch die beste Wirksamkeit hinsichtlich eines langfristigen Transplantatüberlebens erzielt wurde. Empfänger von Nieren hirntoter Spendern mit Ausnahme von Tieren mit einem erhöhten Dosierungsprotokoll von Sirolimus in Kombination mit CsA und mit oder ohne additivem rPSGL-Ig (Gruppe 6C) überlebten die 150tägige Nachbeobachtung. Höher dosiertes Sirolimus (0.4 mg/kg 21 Tage lang) allein verabreicht (Gruppe 6A), schwächt die Nierenfunktion langfristig deutlich. Dies erzeugte progressive chronisch morphologische Veränderungen insbesondere wenn die transplantierten Nieren bereits durch Einflüsse des Hirntodes im Spender geschädigt waren (Gruppe 6E). Die Empfänger der Gruppe 6D, die mit einer verzögert verabreichten und niedrigen Dosis Sirolimus, kombiniert mit CsA und rPSGL-Ig behandelt worden waren, wiesen die besten funktionellen Ergebnisse auf. Diese Tiere waren in ihrem Langzeitverlauf mit denen der syngeneten Kontrolle (Gruppe 4) vergleichbar. Die Ergebnisse der Serumkreatinwerte bestätigten das Ausmaß der Proteinurie. Histo-morphologische Untersuchungen ergaben bei höher dosiertem Sirolimus plus CsA (Gruppe 6E) Zeichen einer ausgeprägten chronischen Abstoßung mit tubulärer Atrophie, die im Vergleich zu lebendspender Transplantaten deutlich stärker ausgeprägt war. Das bedeutet, dass die Auswirkungen des Hirntodes diese Veränderungen intensivierten. Auch die Zugabe von rPSGL-Ig konnte den Zustand einer schweren chronischen Zerstörung nicht aufhalten (Gruppe 6C). Durch Zugabe von rPSGL-Ig zu den immunsuppressiven Protokollen wurde das morphologische Bild jedoch insgesamt bei Tieren mit Transplantaten aus hirntoten Spendern (außer Gruppe 6C) wesentlich verbessert. Wurde rPSGL-Ig mit Sirolimus alleine kombiniert, verringerten sich die inflammatorischen Veränderungen deutlich (Gruppe 6B vs. 6A). Morphologisch wie auch funktionell wiesen die Tiere der Gruppe 6D mit einer verzögerten und niedrigen Dosis Sirolimus, CsA und additivem rPSGL-Ig insgesamt die besten Ergebnisse auf, die nahezu vergleichbar mit denen der syngeneten Kontrolle (Gruppe 4) waren. Immunhistologisch ergab sich für das 1. Signal (TCR / MHC Klasse II) bei den Nieren aus hirntoten Spendern (Gruppe 6A-6D) eine vergleichbare

Expression wie bei den syngen Kontrolltieren (Gruppe 4). In allen lebendspender Transplantaten (Gruppe 5A-5D) war dieses hingegen deutlicher nachweisbar, jedoch war hier das 2. Signal generell deutlich schwächer exprimiert. Während das costimulatorische Signal B7-2 / CD 28 in den Transplantaten aus hirntoten Spendern der Gruppe 6D (150 Tage post-op) schwach nachweisbar war, fand sich für B7-1 und CD28 in diesen Organen aus Tieren, die mit einem Niedrigdosis Protokoll von Sirolimus und CsA sowie rPSGL-Ig behandelt wurden (Gruppe 6D), eine Unterdrückung dieses Signals, das vergleichbar mit der syngen Kontrolle (Gruppe 4) war. Der Anteil CD4 / CD8 doppelmarkierter T-Zellen war in Tieren mit Nieren aus hirntoten Spendern und mit rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 6C und 6D) im Vergleich zu lebendr Transplantaten ohne dessen Verabreichung (Gruppe 5C und 5D) reduziert, bei zusätzlich niedrig dosiertem Sirolimus (Gruppe 6D) sogar auf der Basis der syngen Kontrolle (Gruppe 4) vergleichbar. Das 2. costimulatorische Signal B7-1 / B7-2 mit CTLA-4 war bei der Gruppe 6D, mit einer verzögerten Niedrigdosierung von Sirolimus deutlich exprimiert, hingegen in der Gruppe 6C nur gering nachweisbar. Um die Wirksamkeit von rPSGL-Ig in Kombination mit Sirolimus zu analysieren, wurde, wie auch im Vorversuch, sowohl die Expression der einzelnen Selektine (P-, E-, L-Selektin), als auch ihres Liganden PSGL-1 näher untersucht. Der Ligand PSGL-1 war in der Gruppe 6D mit einer verzögerten Niedrigdosierung von Sirolimus und rPSGL-Ig-Behandlung im Gegensatz zu der relativ starken Expression in den anderen Therapiegruppen (Gruppe 5A-6C), kaum nachweisbar. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Vorversuches mit nur alleiniger Gabe von rPSGL-Ig zum CsA-Standardprotokoll, bei der es zu einer möglichen Blockade ausschließlich von PSGL-1 kam, wurde mit einer verzögerten Niedrigdosierung von Sirolimus und rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 6D), eine Inhibition sowohl von P-, E-, L-Selektin, als auch von PSGL-1 nachgewiesen. Die Zytokine und Chemokine IL-1 β , -2, -6, TNF- α , IFN- γ , TGF- β und MCP-1, die mit inflammatorischen Prozessen einer chronischen Abstoßung einhergehen, waren in der Gruppe 6D herunterreguliert und glichen den Werten der syngen Kontrolltiere (Gruppe 4). Hingegen war das Zytokin IL-10, das mit einer guten Nierenfunktion assoziiert ist, in dieser Gruppe 6D höher exprimiert sowohl im Vergleich zu den funktionell und morphologisch schlechten Gruppen 5B, 6B und 6C, als auch zu den Transplantaten der syngen Kontrolle (Gruppe 4). Auch wenn die

Anzahl der doppelmarkierten CD4+CD25+ Zellen zwischen Gruppe 6C und Tieren mit einer verzögerten Niedrigdosierung von Sirolimus (Gruppe 6D) vergleichbar war, kam es in der zuletzt genannten Gruppe (Gruppe 6D) zu einer deutlichen Expression von CD25+ Zellen. In der durchflusszytometrischen Analyse der paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten dieser Tieren (Gruppe 6D), waren im Vergleich zur hochdosierten Verabreichung des Immunsuppressivums (Gruppe 6C), deutlich mehr CD4+CD25+ T-Zellen vorhanden. Obwohl in der immunhistologischen Untersuchung der Gruppe 6D im Gegensatz zur Gruppe 6C in der Einzelfärbung der Doppelmarkierung von CD4+CD25+ mehr CD25+ Zellen vorhanden waren und damit immunhistologisch kein deutlicher Hinweis auf regulatorische Zellen nachgewiesen wurde, deuten jedoch sowohl die Ergebnisse in den Lymphknoten dieser Tiere mit langfristig funktionell gering beeinflussten Transplantaten (Gruppe 6D), als auch das 2. costimulatorische Signal B7-1 / B7-2 mit CTLA-4, auf das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen hin.

Zusammengefasst lassen diese Untersuchungsergebnisse darauf schließen, dass eine Kombination aus niedrig dosiertem CsA und einer verzögerten Niedrigdosierung Sirolimus, die Toxizitäten der Immunsuppression im Zeitverlauf verringert war. Um die ursprünglich unspezifische Schädigung des Allotransplantates, die durch den HT-Spender verursacht wird, zu reduzieren, sollte zusätzlich zu dieser therapeutischen Immunsuppression rPSGL-Ig verwendet werden.

5. Beantwortung der Fragestellung

1. Welche Veränderungen ruft der Hirntod in den zu transplantierenden Nieren aus Spendern nach Kurzzeitbeobachtung hervor?

Der Hirntod wird als einer der bedeutendsten Risikofaktoren sowohl für die frühe als auch die späte Allotransplantatdysfunktion angesehen. Die Mehrzahl der Organe für eine Transplantation werden Individuen mit massiven und irreversiblen Schädigungen des zentralen Nervensystems entnommen. Experimentell wurde aufgezeigt, dass die zentrale Schädigung eine prompte und massive Expression größerer Histokompatibilitäts-Antigene, Adhäsionsmoleküle, z.B. die Selektine, Zytokine und anderen Faktoren, in den zu transplantierenden Organen hervorruft. Die daraus entstehenden initialen inflammatorischen Reaktionen können ihrerseits eine akute immunologische Reaktion des Empfängers gegen das Transplantat auslösen, und können damit zu einer Abstoßung des Organs führen. Um die kurz- und langfristigen Auswirkungen des Hirntodes auf die zu transplantierende Niere zu untersuchen wurde hierfür ein etabliertes F344/LEW Rattenmodell der chronischen Abstoßung verwendet. 6 Std. nach Eintreten des Hirntodes erschienen die zu transplantierenden Nieren nach Entnahme aus dem Spender, abgesehen von einer geringfügigen tubulären Schwellung, histo-morphologisch noch normal. 3 Tage nach der Nierentransplantation kam es bei den Nieren aus hirntoten Spendern zu einer starken tubulären Nekrose mit weitreichenden perivaskulären PMN und mononuklearen Zellinfiltrationen. Immunhistologisch waren 6 Std. nach dem Hirntod in diesen Tieren erst wenige infiltrierte CD4⁺ und CD8⁺ Zellen festzustellen. Eines der wichtigsten Ereignisse während der T-Zellantwort ist deren Aktivierung. Die Antigenerkennung alleine reicht nicht aus, um diese zu aktivieren. Dabei benötigen die T-Zellen mindestens zwei Signale, um voll aktiviert zu werden. Das erste antigenspezifische Signal wird durch die Bindung des TCR mit dem MHC und einem Peptidkomplex auf den APC gebildet. Das zweite costimulatorische Signal ist erforderlich, um eine apoptotische oder anergische Antwort des Lymphozyten zu vermeiden. Die Interaktion des CD28 auf

den Lymphozyten mit den B7 Proteinen seitens der Antigen präsentierenden Zellen (APC) liefert das notwendige costimulatorische Signal. CD28 spielt eine Rolle bei der Aktivierung der T-Zelle, während CTLA-4 als Inhibitor der Immunantwort fungiert und diese herunterreguliert. Bei den Transplantaten war 6 Std. nach Induktion des Hirntodes sowie auch noch 3 Tage nach Transplantation das 1. Signal, bestehend aus doppelt positiven Ereignissen zwischen T-Zellrezeptor und MHC Klasse II Komplex nicht und das 2. costimulatorische Signal B7-1 / B7-2 mit CD28 nur schwach exprimiert. Das Infiltrat an CD4+ Zellen war jedoch 3 Tage nach Transplantation deutlich stärker ausgeprägt, wobei das 1. Signal zu diesem Zeitpunkt insgesamt sehr gering nachweisbar war. Das bedeutet, dass zu diesem frühen Zeitpunkt die Zellen erst minimal aktiviert waren. Dies stimmt sowohl mit den funktionellen, als auch morphologischen Ergebnissen überein.

2. Welche Rolle spielt der Hirntod als spenderspezifischer Faktor für das langfristige Transplantatüberleben nach allogener Nierentransplantation?

Am Ende des Untersuchungszeitraumes, d. h. 200 Tage nach Transplantation wiesen die Transplantate hirntoter Spender aus Empfängertieren ohne rPSGL-Ig-Behandlung zunehmende Veränderungen einer chronischen Abstoßung auf. Morphologisch zeigte sich eine weitgehende Zerstörung der Gewebsarchitektur. Die Nieren dieser Gruppe befanden sich im Endstadium einer chronischen Nephropathie und wiesen eine starke Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie sowie dichte Zellinfiltrate auf. Diese Tiere unterlagen einer signifikant höheren Proteinausscheidung im Urin im Vergleich zu Lebendspendern. Damit untermauern diese Daten das morphologische Bild. Im Gegensatz dazu waren die Nieren von Lebendspendern unverändert. Immunhistologisch kam es zu einer deutlichen Infiltration an CD4+ und CD8+ Zellen. Das 1. Signal (TCR / MHC Klasse II) war zu diesem Zeitpunkt deutlicher exprimiert als 3 Tage nach Transplantation. Das 2. costimulatorische Signal B7-1 / B7-2 mit CD28 war zum Spätzeitpunkt ebenso stärker

nachweisbar als 6 Std. nach Induktion des HT als auch 3 Tage nach der Transplantation, wobei sich insgesamt das Signal B7-2 mit CD28 intensiver darstellte als die Interaktion von B7-1 mit CD28. Die Kombination des 2. costimulatorischen Signals B7-1 mit CTLA-4 war am Ende des Untersuchungszeitraumes von 200 Tagen insgesamt schwächer ausgeprägt als zu beiden frühen Zeitpunkten. Diese Ergebnisse zeigen, dass in Transplantaten aus hirntoten Spendern 200 Tage nach Transplantation eine massive Infiltration aktivierter Zellen vorhanden war, die als verantwortlich für immunologische Reaktionen anzusehen sind. Diese immunhistologischen Daten untermauern das funktionell und morphologisch schlechte Zustandsbild der Tiere, die sich insgesamt im Endstadium einer chronischen Transplantat-Nephropathie befanden.

3. Wie können die Auswirkungen des Hirntodes therapeutisch beeinflusst werden? Ist ein klinischer Einsatz dieser neuen therapeutischen Strategien denkbar?

Aufgrund des Hirntodes werden inflammatorische Prozesse ausgelöst, die sich unter anderem initial in einer Expression von Adhäsionsmolekülen, beispielsweise den P-, E-, und L-Selektinen, äußert. Die verstärkte Expression dieser Selektine vermittelt die Adhäsion von Blutplättchen, polymorphkernigen Leukozyten (PMN), Monozyten und einigen Lymphozyten an die Gefäßwand. Daraufhin kommt es zu einer Transmigration dieser Zellen durch die Gefäßwand, die somit inflammatorische Prozesse einleiten. Durch Verwendung einer rekombinanten löslichen Form von P-Selektin-Glykoprotein-Ligand (rPSGL-Ig) konnte die initiale Endothelzell-Adhäsion mononuklearer Zellen und damit der Effekt auf die inflammatorische Antwort, die durch den Hirntod verursacht werden, inhibiert werden. Bei den Tieren wurde drei Std. nach der zentralen Schädigung 50µg rPSGL-Ig intravenös injiziert, um vor der Entfernung der zu transplantierenden Niere eine verstärkte Adhäsion von Zellen über P- und E-Selektine von Beginn an zu verhindern. Zudem wurde den Transplantatempfängern unmittelbar nach Transplantation eine zweite Dosis rPSGL-Ig intravenös verabreicht. Die Dosierung von 50µg der Substanz rPSGL-

Ig wurde in Vorversuchen ausgetestet. Der Ligand PSGL-1 wird von fast allen Leukozyten exprimiert und von E-, L- und P-Selektin erkannt. Die in dieser Studie verwendete rekombinante lösliche Form besteht aus den 47 N-terminalen Aminosäuren des humanen PSGL-1-Moleküls, fusioniert mit nicht aktiviertem humanem IgG1 Fc. Obwohl PSGL-1 mit allen drei Selektinen (P-, E- und L-Selektin) interagiert, besitzt rPSGL-Ig die höchste Affinität zu P-Selektin, hingegen zu L-Selektin die geringste. Daher scheint die alleinige Interaktion von P-Selektin mit PSGL-1 ausreichend, um das Phänomen des Rollens und Anheftens von Leukozyten am Gefäßendothel zu ermöglichen. Die Behandlung mit rPSGL-Ig sowohl im Spender, d.h. 3 Std. nach der Induktion des Hirntodes, als auch im Empfänger unmittelbar nach der Nierentransplantation, führte zu einer deutlichen funktionellen und strukturellen Verbesserung der Spendernieren aus hirntoten Tieren. 200 Tage nach Transplantation zeigten diese Transplantate aus hirntoten Spendern minimale morphologische Veränderungen und gering erhöhte Proteinurie Werte auf. Dies wurde bei Nieren aus Empfängern, die mit rPSGL-Ig behandelt wurden im Gegensatz zu Tieren ohne rPSGL-Ig-Behandlung durch ein vermindertes Zellinfiltrat an CD4+CD8+ auch immunhistologisch nachgewiesen. Hingegen war 6 Std. nach Induktion des Hirntodes in Tieren mit oder ohne rPSGL-Ig-Behandlung noch kaum eine Infiltration von CD4+ und CD8+ Zellen festzustellen. Zudem war das 1. Signal (TCR / MHC Klasse II) nicht und das 2. costimulatorische Signal (B7-1 / B7-2 mit CD28) nur schwach exprimiert. Bei Tieren ohne rPSGL-Ig-Behandlung kam es im Gegensatz zu behandelten Tieren 3 Tage nach Transplantation zu einem stärkeren Infiltrat an CD4+ Zellen. Nach rPSGL-Ig-Behandlung war hingegen das 2. Signal B7-1 / B7-2 mit CTLA-4 deutlich nachweisbar. Diese Organe enthielten deutlich mehr CD4+CD25+ und CTLA-4 T-Zellen als Transplantate aus Tieren die kein rPSGL-Ig erhielten rPSGL-Ig scheint daher regulatorische T-Zellen, die für die Aufrechterhaltung der Transplantatfunktion eine wichtige Rolle spielen, zu begünstigen. Dies wird vermutlich dadurch erklärt, dass der Effekt von rPSGL-Ig durch eine Blockade von P-Selektin zu sehen ist, die wiederum die Interaktion von P-Selektin mit PSGL-1 und damit das Anheften der Zellen an die Gefäßwand verhindert. Somit wird die Transmigration dieser

Zellen verhindert, und es resultiert, wie auch histologisch gesehen wurde, eine verminderte Zellinfiltration in die vorgeschädigten Transplantate. Immunhistologisch zeigt sich dies schon 3 Tage nach der Transplantation in Tieren mit einer rPSGL-Ig-Behandlung durch eine deutlich verminderte Expression von PSGL-1, die auch noch nach 200 Tagen beobachtet wurde. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich der klinische Einsatz von rPSGL-Ig als additive Substanz zu bestehenden immunsuppressiven Protokollen durch selektive Behandlung des Organs, des Spenders und / oder des Empfängers vor und nach einer allogenen Nierentransplantation als sehr nützlich erweisen kann. Es werden frühe inflammatorische Prozesse die durch den Spender-Hirntod und den nachfolgenden Ischämie-/ Reperfusionsschaden verursacht werden unterdrückt und dadurch das langfristige Transplantatüberleben verbessert. Zusammenfassend ist damit festzustellen, dass nicht nur aufgrund der nachgewiesenen Wirksamkeit der Substanz im Tierexperiment, sondern auch aufgrund der Tatsache, dass es sich bei rPSGL-Ig um ein human abgeleitetes Molekül handelt ein klinischer Einsatz denkbar erscheint. Ein Wirksamkeitsnachweis in einem nachfolgenden Großtierversuch würde dieses Ergebnis untermauern.

4. Kann durch Kombination aus niedrig dosiertem Cyclosporin A (CsA) und einem nicht-Calcineurin-Inhibitor, wie Sirolimus zur Reduktion der CsA bedingten Toxizität, ein langfristiges Überleben des Nierentransplantates erzielt werden? Welche Auswirkungen zeigen sich aus funktioneller Sicht?

In dem hierfür verwendeten Rattenmodell der chronischen Abstoßung zeigte sich bei niedriger Dosierung von CsA in Kombination mit einer höheren Dosis Sirolimus in lebendspender Transplantaten 150 Tage nach Transplantation eine intensive chronische Veränderung mit dichten mononuklearen Zellinfiltraten, einer moderaten Glomerulosklerose, interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie. Transplantate mit einer niedrig dosierten Gabe von Sirolimus wiesen hingegen nur fokale mononukleare Zellinfiltrate und minimale strukturelle Veränderungen in Bezug auf Glomerulosklerose und Arteriosklerose auf. Auch

die Proteinuriewerte dieser Tiere waren deutlich niedriger. Immunohistologisch zeigte sich in lebendspender Transplantaten ein gleichermaßen starkes Infiltrat an CD4+CD8+ Zellen und eine annähernd gleiche Expression des 1. (TCR / MHC Klasse II) Signals. Sowohl das 2. Signal (B7-2 mit CTLA-4), als auch der Anteil doppelmarkierter CD4+CD25+ Zellen war in Tieren mit einer niedrigen Dosierung von Sirolimus und CsA deutlicher vorhanden, als in Tieren mit einer hohen Dosierung. Diese Untersuchungsergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Kombination aus einer niedrig dosierten Gabe von CsA und Sirolimus die Toxizitäten der Immunsuppression im Langzeitverlauf verringert.

5. Können neue therapeutische Ansätze zur Beeinflussung des unspezifisch schädigenden Spenderfaktors Hirntod mit gegenwärtigen immunsuppressiven Protokollen kombiniert werden? Welche Auswirkungen haben solche multimodalen Konzepte im Langzeitverlauf nach allogener Nierentransplantation?

Mit einer neuen multimodalen Therapie aus rPSGL-Ig und einer verzögerten Niedrigdosierung Sirolimus kombiniert mit einer niedrigen Dosis CsA wiesen die Transplantate aus hirntoten Spendern erhaltene der Tubuli bei fehlender Fibrose auf und waren auch funktionell mit den syngen Transplantaten vergleichbar. Der Anteil CD4+CD8+ doppelmarkierter T-Zellen war in rPSGL-Ig behandelten Empfängern mit verzögertem und niedrigdosiertem Sirolimus und niedriger Gabe von CsA im Vergleich zu Transplantaten ohne rPSGL-Ig-Behandlung deutlich reduziert und mit der syngen Kontrolle vergleichbar. Die Expression des 1. Signals (TCR / MHC Klasse II) war in hirntoten Spendertransplantaten schwächer als in lebendspender Transplantaten. Bei rPSGL-Ig behandelten Tieren mit verzögert und niedrig dosiertem Sirolimus und CsA war im Vergleich zu lebendspender Transplantaten ohne rPSGL-Ig-Gabe das 2. Signal (B7-1 mit CD28) inhibiert, hingegen das Signal B7-1 / B7-2 mit CTLA-4 deutlich exprimiert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Vorversuches mit nur alleiniger Gabe von rPSGL-Ig zum Standardprotokoll von 1,5 mg/kg CsA für 10 Tage, bei der es zu einer möglichen Blockade

ausschließlich des PSGL-1 kam, wurde mit verzögert und niedrig dosiertem Sirolimus und additivem rPSGL-Ig eine Inhibition sowohl von P-, E-, L-Selektin, als auch von PSGL-1 nachgewiesen. Zudem waren in diesen Tieren die Zytokine und Chemokine IL-1 β , -2, -6, TNF- α , IFN- γ , TGF- β und MCP-1, die mit inflammatorischen Prozessen und einer chronischen Abstoßung einhergehen, herunterreguliert und glichen den Werten syngener Kontrollen. Hingegen war das Zytokin IL-10, das für Th2-Zellen charakteristisch ist, in diesen Tieren mit verzögert und niedrig dosiertem Sirolimus und rPSGL-Ig hochreguliert. Diese Th2-Zellen werden mit einer langen Organakzeptanz assoziiert und sind CD4+CD25+. Zusätzlich waren in der durchflusszytometrischen Analyse der paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten dieser Tiere im Vergleich zur hochdosierten Gabe des Immunsuppressivums deutlich mehr CD4+CD25+ T-Zellen vorhanden. Obgleich sich in der immunhistologischen Untersuchung mittels der Doppelmarkierung CD4+CD25+ kein deutlicher Hinweis auf regulatorische Zellen fand, deuten jedoch sowohl die Ergebnisse in den Lymphknoten dieser Tiere mit langfristig funktionell gering beeinflussten Transplantaten, der deutliche Nachweis von IL-10, mehr CD25+ Zellen in der immunhistologischen Einzelfärbung, als auch das 2. costimulatorische Signal (B7-1 / B7-2 mit CTLA-4), auf das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen hin. Diese Untersuchungsergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Kombination aus niedrig dosiertem CsA und Sirolimus, die Toxizitäten der Immunsuppression im Zeitverlauf verringert. Um die ursprüngliche unspezifische Schädigung des Allotransplantates, die durch den Faktor Hirntod im Spender verursacht wird, zu reduzieren, sollte zusätzlich zu dieser therapeutischen Immunsuppression rPSGL-Ig verwendet werden.

6. Diskussion

Die langfristige Überlebensrate solider Organ-Allotransplantate hat sich durch eine effektivere Immunsuppression in den vergangenen Jahren verbessert. Aufgrund einer weiter zunehmenden Schere zwischen der Anzahl an Patienten, die auf ein geeignetes Transplantat warten und den zur Verfügung stehenden Spenderorganen werden immer häufiger Transplantate potentiell verringerter Qualität aus den marginalen Spendern akzeptiert, um den weiter zunehmenden Organmangel zu reduzieren. Dabei zeigt sich, dass eine Vielzahl an Spender-assoziierten Risikofaktoren das kurz- und langfristige Transplantatüberleben ungünstig beeinflussen. In jüngster Zeit konzentrierte sich das Interesse hauptsächlich auf die systemischen Veränderungen, die sich nach dem Hirntod im Spender ereignen und inflammatorische Prozesse auslösen. Die insgesamt schlechteren Langzeitergebnisse Nierentransplantation hirntoter Spender im Vergleich zur Lebendspendertransplantation untermauern diese Auffassung (94).

6.1. *rPSGL-Ig-Versuch*

Der Hirntod führt im Organspender zu unspezifischen peripheren Organveränderung an deren Anfang eine massive Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen stehen, die durch den Prozess der Organentnahme und nachfolgender Ischämiezeit und Reperfusion noch verstärkt werden. Die sich daraus entwickelnde inflammatorische Reaktion kann wiederum immunologische Abstoßungsreaktionen nach sich ziehen. (4-6). Diese Beobachtung würde die offensichtliche Synergie zwischen den Auswirkungen einer verspäteten Nierentransplantatdysfunktion und akuten Abstoßungsvorgängen erklären (94). Zu einem späteren Zeitpunkt nach Erholung des Transplantates von initialen Schäden werden schrittweise chronische immunologische Reaktionen des Organs beobachtet, die mit einer schrittweisen Verschlechterung der Transplantatfunktion und einem Organversagen langfristig einhergehen (19). Das zunehmende Verständnis des Einflusses dieser anfänglich unspezifischen Schäden transplantiert Organe, die durch den Hirntod im Organspender ausgelöst werden, lenkt zunehmend die Aufmerksamkeit auf deren genaue Untersuchung und mögliche therapeutische Einflussnahme noch vor der Übertragung des Transplantates in den Empfänger. Dieser Zusammenhang zwischen dem Hirntod des Spenders und den

inflammatorischen Veränderungen in den peripheren Organen des Spenders sind bislang nicht völlig geklärt. Der Hirntod ist ein zentrales Ereignis, das mit einer massiven Freisetzung von Katecholaminen und massiven Veränderungen des Blutdrucks mit initialen Blutdruckkrisen, oftmals gefolgt von einer Hypotonie, einhergeht. Durch zentrale Regulationsmechanismen kommt es zu einer peripheren Vasokonstriktion und Organischämie (6, 9, 95). Jedoch spielen auch andere Faktoren, die beispielsweise durch endokrine Veränderungen ausgelöst werden und mit metabolischen Schädigungen in peripheren Organen in Verbindung stehen, ebenso eine bedeutende Rolle (95-98). Zudem werden auch inflammatorische Faktoren nach der zentralen Schädigung in das Blut freigesetzt. Diese inflammatorischen Prozesse wurden sowohl klinisch in hirntoten Patienten durch die Expression transkriptioneller Werte von IL-1 β , TNF α und IL-6 mit Ereignissen fokaler zerebraler Ischämie (99, 100), als auch experimentell durch eine hohe Expression von TNF α , IL-1, IL-2, IL-6 und IL-10 im Blut hirntoter Spendertiere nachgewiesen (4, 6). Aktivierte Gefäßendothelzellen exprimieren als erste Adhäsionsmoleküle die Selektine (91, 101). Die Stimulierung dieser Selektine vermittelt die Adhäsion von Blutplättchen, PMN, Monozyten und einigen Lymphozyten an die Gefäßwand. Dies hat wiederum eine Transmigration von PMN und Blutplättchen zu Folge, die somit inflammatorische Prozesse einleiten (56, 91, 101) (vgl. Abb. 1).

rPSGL-Ig, eine rekombinante lösliche Form des PSGL-1-Moleküls, inhibiert durch kompetitive Bindung die Selektin-vermittelten Adhäsionsereignisse und verhindert damit die Interaktion zwischen Endothelzellen, Blutplättchen und PMN (54, 56). In der vorliegenden Untersuchung wurden die Auswirkungen der Behandlung mit rPSGL-Ig auf die initialen inflammatorischen Veränderungen untersucht, die durch den Hirntod als zentrales Ereignis auftreten. Der Zeitpunkt der Verabreichung von rPSGL-Ig in diesen Untersuchungen wurde so an die klinische Situation orientiert, dass die Substanz bereits zum initialen Zeitpunkt der Organschädigung durch den Hirntod mit hochexprimierten Liganden einmalig in den Spender (3 Std. nach Induktion des Hirntodes), als auch nach Beendigung der Transplantation, mit einer zweiten Dosis in den Empfänger, injiziert wurde (Gruppe 3A-3C). Die Behandlung mit rPSGL-Ig sowohl im Spender als auch im Empfänger führte zu einer deutlichen funktionellen und strukturellen Verbesserung der Spendernieren aus hirntoten Tieren und war damit mit denen der syngenen Gruppe (Gruppe 1) vergleichbar. Unbehandelte Empfänger mit Nieren aus hirntoten

Spenderorganen (Gruppe 2), entwickelten bereits 8 Wochen nach der Transplantation eine erhöhte Proteinurie. Um im Empfänger bei zusätzlichem Ischämie- und Reperfusionsschaden, der auch in syngenen Empfängern zu einer passageren Expression von Selektinen führt, ausreichende Wirkspiegel zu erzielen, wurde eine zweite Dosis von rPSGL-Ig dem Empfänger verabreicht (102). Dieses dient der Blockade der Selektine während der ersten Tage nach der Reperfusion im Empfänger. Pharmakokinetische Studien ergaben, dass die Halbwertszeit nach Gabe von rPSGL-Ig in normalen Ratten 100 Std. beträgt. Daher ist bei dem angewandten Protokoll von einer adäquaten rPSGL-Ig-Konzentration auszugehen, um exprimierte Selektine während der ersten Tage nach Transplantation zu blockieren. Dies wurde anhand der mit rPSGL-Ig behandelten Versuchstiere (Gruppe 3) deutlich, bei denen eine signifikant verringerte Expression von P-Selektin und auch des Liganden PSGL-1 im Transplantat als Hinweis für eine deutlich verringerte Infiltration aktivierter Zellen beobachtet wurde. Im Langzeitverlauf kam es zu einer funktionellen Verbesserung der transplantierten Nieren. 200 Tage nach Transplantation zeigten Tiere der Gruppe 3C im Vergleich zur unbehandelten Gruppe 2C deutlich erniedrigte Proteinuriewerte. Morphologisch fand sich eine nur fokale tubuläre Nekrose am korticomedullären Übergang und nur wenige Zellinfiltrate. Die Transplantate wiesen im Vergleich zu syngenen Kontrollen (Gruppe 1) keine signifikanten Unterschiede auf, die mit weniger als 10% morphologischer Transplantatveränderungen nur minimal strukturelle Veränderungen beinhalteten. Transplantate hirntoter Spender in Empfängern ohne rPSGL-Ig Behandlung (Gruppe 2C) waren im Endstadium einer chronischen Abstoßung und wiesen eine starke Glomerulosklerose (>90%), interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie und dichte Zellinfiltrate auf. Die einmalige Behandlung des Spenders und des Empfängers mit rPSGL-Ig reduziert unspezifische akute inflammatorische Ereignisse auf zellulärer und molekularer Ebene dramatisch und verhindert darüber hinaus das Eintreten chronischer Veränderungen im Langzeitverlauf.

Es gibt viele Hinweise darauf, dass hauptsächlich T-Zellen (CD4+ und CD8+) für die Abstoßung von soliden Organtransplantaten verantwortlich sind. Diese T-Zellen erkennen Alloantigene (Spender MHC) auf der Zelloberfläche des Transplantates und werden somit zur Proliferation angeregt. Eines der wichtigsten Ereignisse während der T-Zellantwort ist deren Aktivierung. Die Antigenerkennung alleine reicht jedoch nicht

aus, um diese zu aktivieren. Es ist inzwischen klar, dass T-Zellen mindestens zwei Signale benötigen, um voll aktiviert zu werden (vgl. Abb. 2). Das erste antigenspezifische Signal wird durch die Bindung des T-Zellrezeptors mit dem Haupthistokompatibilitäts- und einem Peptidkomplex auf den Antigen präsentierenden Zellen gebildet. Das zweite costimulatorische Signal ist erforderlich, um eine apoptotische oder anerge Antwort des T-Lymphozyten zu vermeiden. Die Interaktion von CD28 auf dem T-Lymphozyten mit den B7 Proteinen seitens der APC liefert dieses notwendige costimulatorische Signal (64, 103). Sowohl B7-1 als auch B7-2 sind in der Lage, das CD28- und CTLA-4-Oberflächenmolekül zu binden (71). CD28 spielt eine Rolle bei der Aktivierung der T-Zelle, während CTLA-4 eine Funktion als inhibitorischer Rezeptor für das Herunterregulieren der Immunantwort besitzt (71, 78). Zudem beeinflusst CD28 möglicherweise auch die Differenzierung von Th-Zellen (104). Dagegen lassen jüngere Forschungsergebnisse darauf schließen, dass CTLA-4 eine Rolle bei der T-Zelltoleranz spielen könnte (71, 80). Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren mit Nieren aus hirntoten Spendern ohne rPSGL-Ig Behandlung (Gruppe 2C), zeigte sich immunhistologisch in der mit rPSGL-Ig behandelten Gruppe (Gruppe 3C) 200 Tage nach der Transplantation ein deutlich vermindertes CD4+ und CD8+ Zellinfiltrat im Transplantat. Unter diesen CD4+ Zellen befanden sich in den behandelten Tieren deutlich mehr CD4+CD25+ Zellen. Dieses Phänomen wurde auch durchflusszytometrisch in den peripheren Lymphknoten dieser Tiere beobachtet. Interessanterweise wiesen die mit rPSGL-Ig behandelten Tiere (Gruppe 3C) in ihren Transplantaten verhältnismäßig mehr Zellen auf, die das erste-, jedoch weniger das zweite Signal B7-1 / oder B7-2 zusammen mit CD28 in der Doppelbindung exprimierten. In unbehandelten Tieren ohne rPSGL-Ig (Gruppe 2C) fanden sich dagegen mehr Zellen, die dieses zweite Signal auf ihrer Oberfläche aufwiesen. Das zweite costimulatorische Signal B7-1 oder B7-2 mit CTLA-4 in den mit rPSGL-Ig behandelten Tieren (Gruppe 3B und 3C) war stärker exprimiert als in den unbehandelten Vergleichsgruppen (Gruppe 2B und 2C). Dies weist auf eine herunterregulierte Immunantwort hin. Bemerkenswert ist, dass verstärkt CD4+CTLA-4+ Zellen in der mit rPSGL-Ig behandelten Gruppe (Gruppe 3C) vorgefunden wurden. Unter dem insgesamt vergleichsweise geringeren Zellinfiltrat an CD4+ und CD8+ Zellen in dieser Gruppe war das zweite Signal B7-1 oder B7-2 mit CD28

herunterreguliert, hingegen die Interaktion von B7-1 oder B7-2 mit CTLA-4, wie oben erwähnt, stärker vorhanden. Damit wäre eine verstärkte Überführung aktivierter Zellen nach Antigenkontakt (TCR / MHC-Klasse II) in einen anergen Zustand bei gleichzeitig vorgefundenen Zellen mit regulatorischen Charakter (CD4+CD25+ und CTLA-4) in diesen Transplantaten denkbar. Dieses Phänomen fand sich in unbehandelten Tieren (Gruppe 2C) nicht. Hier lag im Vergleich zu der behandelte Gruppe 3C ein stärkeres Infiltrat an CD4+ und CD8+ Zellen vor. Die Transplantate der unbehandelten Gruppe (Gruppe 2C) wiesen im Verhältnis zu den behandelten Tieren (Gruppe 3C) mehr costimulatorische Signale (B7-1 / B7-2 mit CD28) auf der Oberfläche auf und gingen morphologisch mit Zeichen einer chronischen Abstoßung einher.

Systemische Veränderungen während und nach der Phase des Hirntodes im Spender und der Ischämie-/Reperfusionphase im Empfänger, führen zu einer Produktion entzündlicher Faktoren in den Nieren sowie anderen peripheren Organen (6, 94). Als Folge der Entzündung exprimieren geschädigte Endothelzellen auf ihrer Oberfläche Selektine. Dieses führt zur Rekrutierung der PMN am Gefäßendothel. Haben die PMN einmal fest an Endothelzellen gebunden, kommt es zu einer Extravasation an den Entzündungsort. Intrazelluläres P-Selektin wird innerhalb weniger Minuten an der Endotheloberfläche exprimiert, gefolgt von E-Selektin. Anschließend kommt es zur Bindung der auf der Oberfläche der PMN befindlichen Liganden L-Selektin und PSGL-1 mit endotheliale E- und P-Selektin. Als Resultat werden PMN in ihrer Fließgeschwindigkeit entlang der Gefäßwände abgebremst und der Vorgang der Diapedese eingeleitet (vgl. Abb. 1) (91, 97, 98, 100). rPSGL-Ig, eine rekombinante lösliche Form von PSGL-1, hemmt die Selektin-vermittelten Adhäsionsentwicklungen und verhindert die Interaktion zwischen den vaskulären endothelialen Zellen, Blutplättchen und PMN (105). Zwar interagiert PSGL-1 mit allen drei Selektinen (P-, E- und L-Selektin), jedoch besitzt rPSGL-Ig die höchste Affinität zu P-Selektin, dagegen zu L-Selektin die geringste (93). Die alleinige Interaktion von P-Selektin mit PSGL-1 ist daher ausreichend um den Vorgang der rollenden und stationären Adhäsion der PMN am Gefäßendothel zu ermöglichen (vgl. Abb. 1). Wie in den durchgeführten Versuchen der Gruppen ohne und mit rPSGL-Ig (Gruppen 2A bis 3C) zu erkennen war, scheint die Behandlung mit rPSGL-Ig keine Auswirkung auf das Ausmaß der Expression von P-Selektin zu haben. Der Effekt einer rPSGL-Ig-Behandlung ist somit

mehr in einer Blockade, als in einer Suppression von P-Selektin zu sehen. Dies resultiert, wie in den morphologischen Ergebnissen gesehen, in einer verminderten Zellinfiltration in den vorgeschädigten Transplantaten (Gruppe 3C). 3 Tage nach Transplantation zeigt sich somit in Tieren mit rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 3B) eine deutlich verminderte Expression von PSGL-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Gruppe 2B). Dieser Effekt war auch noch nach 200 Tage mit rPSGL-Ig-Behandlung deutlich sichtbar (Gruppe 3C).

Die Folgeerscheinungen der Hirntodeschädigung sind komplexer als die Auswirkungen der Ischämie. Daher sollte eine selektive Behandlung des Organs, des Spenders und / oder des Empfängers, durchgeführt werden. Die Unterdrückung inflammatorischer Prozesse und der Selektine, die durch den Hirntod ausgelöst werden, könnte, wie in diesen Untersuchungen beschrieben, eine solche Strategie sein.

6.2 Sirolimus Versuch

Unspezifische Spender-assoziierte Faktoren können eine akute Allotransplantatabstoßung im Empfänger auslösen und durch Induktion chronischer Abstoßungsvorgänge damit zu einer zunehmenden Transplantatdysfunktion beitragen (4, 106). Organe marginaler oder suboptimaler Spender funktionieren in diesem Zusammenhang langfristig wahrscheinlich weniger zufrieden stellend. Dieses wird durch die hämodynamische Instabilität während und nach dem Hirntod oder aufgrund vorbestehender Zustände wie Hypertonie oder Diabetes im Spender erklärt (107). Die insgesamt schlechteren Ergebnisse bei Nierentransplantaten hirntoter Spender im Vergleich zur Lebendspendertransplantation untermauern diese Auffassung (94). Es existiert darüber hinaus die Möglichkeit, dass Calcineurin-Inhibitoren wie CsA durch ihre Nephrotoxizität zu einem Kontinuum zwischen einer frühen Antigen unabhängigen Inflammation und einer nachfolgenden Immunaktivierung beitragen. Obwohl die Verwendung eines solchen Immunsuppressivums ganz offensichtlich die Überlebensraten solider Organtransplantate substantiell verbessert hat, ist die Verlustrate aufgrund seiner chronischen Nephrotoxizität relativ konstant geblieben.

Der Nicht-Calcineurin-Inhibitor Sirolimus wurde in der vorliegenden Arbeit in Kombination mit niedrig dosiertem CsA verabreicht, um dessen Nephrotoxizität zu minimieren. Die Wirksamkeit dieses antiproliferativen Immunsuppressivums wurde in

randomisierten klinischen Studien eindrücklich demonstriert (108-110). Während CsA die Immunität des Empfängers durch Inhibition der Zytokinproduktion in T-Zellen unterdrückt, verringert Sirolimus Zytokin-induzierte Signaltransduktionswege und schwächt die T-Zellaktivierung durch Blockade bei der Progression des Zellzyklus in die G1-Phase. Dadurch verhindert Sirolimus wirkungsvoll eine akute Transplantatabstoßungsreaktion (108, 111-113). Podder und Mitarbeiter vermuteten, dass Sirolimus dazu beitragen könnte, dass sich eine transplantierte Niere von einem I/R-Schaden erhohlen könnte, da es mit dem Membran P-Glykoprotein interagiert. Auch könnte die Apoptose tubulärer Zellen verringert und ihre regenerative Antwort verbessert werden. Würde Sirolimus mit CsA verabreicht, könnte nicht nur der gesamte Serum-Blutspiegel von CsA erhöht, sondern auch deren Akkumulation in tubulären Zellen ermöglicht werden (114). Die Vorteile und Einschränkungen dieser wichtigen Immunsuppressiva wurden in Tierversuchen an einem chronischen Abstoßungsmodell mit LEW-Empfängern und F344-Spendern überprüft (Gruppe 5A). Auch wenn die Empfänger langfristig überlebten, entwickelten sie doch in ihren Transplantaten die typischen progressiven und strukturellen Veränderungen einer tubulären Atrophie, Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose. Wurden Nieren hirntoter Spender verwendet, so war der Prozess chronischer Abstoßung beschleunigt und intensiviert (Gruppe 2C). Hoch dosiertes Sirolimus (0.4 mg/kg über 21 Tage lang post Transplantationem) allein verabreicht (Gruppe 6A) oder in Kombination mit CsA selbst in geringer Dosis (1 mg/kg über 10 Tage, Gruppe 5C), schwächte die Nierenfunktion langfristig dramatisch und erzeugte progressive, chronische und morphologische Veränderungen, insbesondere wenn die transplantierten Nieren bereits durch Einflüsse des hirntoten Spenders beschädigt waren (Gruppe 6E). Diese experimentellen Beobachtungen scheinen direkte klinische Parallelen zu besitzen.

Systemische Veränderungen, die sich im hirntoten Spender und während der Transplantation entwickeln, verursachen eine Produktion nicht-spezifischer, Antigen-unabhängiger inflammatorischer Faktoren in den Nieren und anderen peripheren Organen (55, 115, 116). Durch Freisetzung von Zytokinen und anderen Mediatoren kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion auf Gefäßendothelzellen, die im Anschluss eine Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die Selektine, exprimieren. Deren Anwesenheit initiiert den Bindungsprozess von PMN an das aktivierte Endothel. Durch

Interaktion zwischen den Selektinen auf dem Endothel und ihren Liganden auf den PMN im Blut werden diese Zellen in ihrer Fließgeschwindigkeit abgebremst.

Nachfolgende Interaktionen mit Integrinen und Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie verursachen eine stationäre Leukozytenadhäsion an das Endothel und ermöglichen, dass die Leukozyten nachfolgend durch die Gefäßwand an den Entzündungsort im Gewebe wandern können (11, 56, 117). PSGL-1 ein hochaffiner Counterrezeptor für P- und E-Selektin ist ein sulfatiertes Sialyl Lewis X-tragendes Glykoprotein, das konstitutiv auf der Oberfläche inflammatorischer Zellen exprimiert wird und die Diapedese von Leukozyten in entzündetes oder in Abstoßung befindliches Gewebe vermittelt (118). rPSGL-Ig, eine rekombinante lösliche Form des PSGL-1, bindet an Selektine auf aktivierten Endothelzellen und verhindert damit eine Interaktion mit zirkulierenden Leukozyten und Blutplättchen (101, 119). Die Gabe von rPSGL-Ig zum Zeitpunkt der Transplantation verhindert viele nachfolgende inflammatorische Ereignisse in transplantierten Nieren, die in hirntoten Spender und nachfolgend durch I/R ausgelöst wurden (Gruppe 3C). Ziel nach Organtransplantation ist das Erreichen einer maximalen Wirksamkeit hinsichtlich eines langfristigen Überlebens des Transplantates, wobei die Nebenwirkungen der Immunsuppressiva so gering als möglich gehalten werden sollen. In dieser Studie entwickelten Tiere, die mit rPSGL-Ig und einer Kombination von niedrig dosiertem Sirolimus sowie Cyclosporin (Gruppe 6D) behandelt wurden, im Langzeitverlauf keine funktionellen oder morphologischen Anzeichen einer chronischen Abstoßung. Sowohl die Basiswerte der Zytokin-Genexpression verschiedener T-Helferzellen vom Typ 1 (IL-2, IFN- γ) und Makrophagen-assoziierten Zellprodukte (IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α), die in den chronischen Prozess der am stärksten beeinträchtigten Allotransplantate involviert waren, als auch die der T-Helferzellen vom Typ 2-assoziierten Produkte (IL-10) in den am geringsten beschädigten Transplantaten, bestätigen dieses Ergebnis. Der Mangel an einer costimulatorischen T-Zellsignalgebung (B7-1 / B7-2 mit CD28) in der besten Gruppe (Gruppe 6D) untermauert ebenfalls diese Beobachtungen. Der Anteil an CD4⁺ / CD8⁺ doppeImarkierten T-Zellen war in Tieren mit einer rPSGL-Ig-Behandlung (Gruppe 6C und 6D) im Vergleich zu Transplantaten ohne dessen Verabreichung (Gruppe 5C und 5D) reduziert, bei verzögerter Niedrigdosierung von Sirolimus (Gruppe 6D) sogar auf der Basis der syngen Kontrolle (Gruppe 4) vergleichbar. Ebenso war in

Gruppe 6D die Expression des ersten (TCR / MHC Klasse II) und zweiten Signals B7-1 / B7-2 mit CD28 deutlich schwächer als in der syngen Kontrolle exprimiert. Hingegen war das 2. costimulatorische Signal B7-1 / B7-2 mit CTLA-4 in der Gruppe 6D deutlich stärker ausgeprägt als in Gruppe 6C. In der Durchflusszytometrie fanden sich in dieser Gruppe (Gruppe 6D) deutlich mehr CD4+CD25+ T-Zellen als in Gruppe 6C mit einer hochdosierten Gabe von Sirolimus. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+ und CTLA-4) hin, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Akzeptanz des Transplantates langfristig spielen.

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass eine deutlich reduzierte und verzögerte Dosis von Sirolimus einen synergistischen Effekt in Kombination mit CsA und additivem rPSGL-Ig nach einer Nierentransplantation aus hirntoten Spendern zeigt und Zellen mit regulatorischen Funktionen positiv beeinflusst. Die Transplantate sind mit den syngen Kontrollen vergleichbar. rPSGL-Ig inhibiert Spender-Hirntod-assoziierte frühe unspezifische inflammatorische Prozesse und kann damit helfen, die Organqualität marginaler Transplantate zu einem vergleichbaren Status wie bei Lebendspendern zu verbessern.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Mehrzahl der Organe für eine Transplantation werden Individuen mit massiven und irreversiblen Schädigungen des zentralen Nervensystems entnommen. Diese werden heute bei weiter zunehmender Organknappheit durch den Pool sogenannter marginaler Organspender erweitert. Anders als bei den Organen aus Lebendspendern, die relativ unberührt vom Transplantationsereignis bleiben, können verschiedene, mit dem hirntoten Spender verbundene bedeutende Veränderungen den Zustand der zu transplantierenden Organe beeinflussen. Die derzeitigen immunsuppressiven Protokolle auf der Basis von Calcineurin-Inhibitoren sind langfristig nephrotoxisch. Die Reduzierung des Anteils an Calcineurin-Inhibitoren zur Vermeidung einer Nierenschädigung kann jedoch zu einem Risiko akuter Transplantatabstoßungen führen. In den 80er Jahren hat CsA eine instrumentelle Rolle bei der Verbesserung der kurzfristigen Überlebensrate von Nierentransplantaten gespielt. Ein langfristiges Überleben des Transplantates und die CsA-Nephrotoxizität stellen jedoch heute ein grundlegendes Problem nach Transplantation dar. Klinische Daten haben gezeigt, dass Sirolimus im Gegensatz zu CsA weniger Nebenwirkungen, wie Nephrotoxizität und Hypertonie, aufweist. Um die toxischen Nebeneffekte in der Klinik zu minimieren, sollte die CsA-Dosis für jeden Patienten maßgeschneidert sein und in Kombination mit anderen nicht-Calcineurin-Inhibitoren, wie Sirolimus verabreicht werden. Während CsA die T-Zellproduktion von Zytokinen hemmt, unterbindet Sirolimus, eine antiproliferative Substanz, durch ein intrazelluläres Signal an den IL-2 Rezeptor, die Progression der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und somit die T-Zellreaktion auf diese Zytokine. rPSGL-Ig inhibiert die durch den Spender-Hirntod und den nachfolgenden Ischämie-/ Reperfusionsschaden hervorgerufenen frühen inflammatorischen Prozesse nach einer allogenen Nierentransplantation und beeinflusst damit Alloantigen-unabhängige Reaktionen im Nierentransplantat in der Frühphase nach Transplantation. Damit verbessert rPSGL-Ig sowohl das Kurzzeit- als auch das Langzeitüberleben allogener Nierentransplantate. Als additive Substanz zu bestehenden immunsuppressiven Protokollen kann rPSGL-Ig somit dazu beitragen, die Qualität von Transplantaten und insbesondere die marginaler Spender initial zu verbessern. Wie in den Tieren mit Organen aus hirntoten Spendern, die zusätzlich mit rPSGL-Ig behandelt

wurden, zu beobachten war, verhinderte rPSGL-Ig die initialen inflammatorischen Prozesse und verbesserte damit das langfristige Transplantatüberleben. Eine höhere Dosierung von Sirolimus plus CsA resultierte bereits bei transplantierten Lebendspender-Nieren in einer verstärkten chronischen Abstoßung und tubulären Atrophie. Empfänger mit Nieren aus hirntoten Spendern, die mit diesem Protokoll behandelt wurden, zeigten eine im Vergleich zu Lebendspender-Organen weitere deutliche Intensivierung der chronischen Abstoßung, die zudem früher auftrat. Die besten Ergebnisse wurden mit niedrig dosiertem CsA sowie einer verzögerten Niedrigdosierung von Sirolimus und additiver Gabe von rPSGL-Ig erzielt werden. Diese Kombination wirkte im Empfänger mit Nieren aus hirntoten Spendern protektiv. Diese Tiere zeigten eine inhibierte Expression verschiedener Gene in T-Helferzellen vom Typ 1 (IL-2, IFN- γ) und Makrophagen-assoziiierter Zellprodukte (IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α), die in den chronischen Prozess der am stärksten beeinträchtigten Allotransplantate involviert waren. Zudem wiesen diese Transplantate eine hohe Expression von T-Helferzellen von Typ 2-assoziierten Produkten (IL-10) auf. Der Anteil an CD4⁺ / CD8⁺ doppelmarkierten T-Zellen in diesen Organen war mit der syngenen Kontrolle vergleichbar. Ebenso war sowohl in diesen Tieren mit niedrig dosiertem CsA sowie einer verzögerten Niedrigdosierung von Sirolimus und additiver Gabe von rPSGL-Ig, als auch in den nur mit rPSGL-Ig und ohne Sirolimus behandelten Tieren, die Expression des ersten Signals (TCR /MHC Klasse II) und zweiten Signal B7-1 oder B7-2 mit CD28 deutlich schwächer, dagegen B7-1 / B7-2 mit CTLA-4 deutlich stärker exprimiert. Durchflußzytometrisch fanden sich in dieser Gruppe deutlich mehr CD4⁺CD25⁺ T-Zellen. Die immunhistologischen Ergebnisse (CD4⁺CD25⁺ und B7-1 / B7-2 mit CTLA-4) und durchflußzytometrischen Daten (CD4⁺CD25⁺) weisen auf das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen hin, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Funktion und Erhaltung des Transplantates spielen. Diese Transplantate zeigten im Langzeitverlauf keine funktionellen oder morphologischen Anzeichen einer chronischen Abstoßung.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass eine Kombination aus niedrig dosiertem Sirolimus und CsA einen synergistischen immunsuppressiven Effekt nach Nierentransplantation aufweisen. rPSGL-Ig wirkt additiv und reduziert frühe

unspezifische oder auch Alloantigen-unabhängige hervorgerufene Schädigung gegenüber dem Transplantat.

8. Literaturverzeichnis

1. Laupacis A, Keown P, Pus N, Krueger H, Ferguson B, Wong C, Muirhead N: A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int* 1996; 50(1):235-42
2. Bonal J, Cleries M, Vela E: Transplantation versus haemodialysis in elderly patients. Renal Registry Committee. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12(2):261-4
3. Bonnet F, Lazard T: [Brain death and organ procurement: a specific context]. *Rev Prat* 1997; 47(18 Spec No):S11-6
4. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Beato F, Milford EL, Hancock WW, Tilney NL: Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Ann Surg* 2000; 232(2):263-71
5. Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, Tjandra-Maga TB, Borgers M, Plets C, Flameng W: Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circulation* 1993; 87(1):230-9
6. Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, Chandraker A, Sayegh MH, Tilney NL: Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation* 1998; 65(12):1533-42
7. Gasser M, Waaga AM, Laskowski IA, Tilney NL: The influence of donor brain death on short and long-term outcome of solid organ allografts. *Ann Transplant* 2000; 5(4):61-7
8. Gasser M, Waaga AM, Kist-Van Holthe JE, Lenhard SM, Laskowski I, Shaw GD, Hancock WW, Tilney NL: Normalization of brain death-induced injury to rat renal allografts by recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(7):1937-45
9. Herijgers P, Leunens V, Tjandra-Maga TB, Mubagwa K, Flameng W: Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines. *Transplantation* 1996; 62(3):330-5
10. Vestweber D, Blanks JE: Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999; 79(1):181-213.

11. Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT: Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* 2000; 103(3):467-79.
12. Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S: Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:155-77
13. Picker LJ: Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(3):394-406
14. Powelson JA, Cosimi AB, Wee S: Monoclonal antibodies in organ transplantation. *Biotechnol Adv* 1993; 11(4):725-40
15. Waaga AM, Gasser M, Laskowski I, Tilney NL: Mechanisms of chronic rejection. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(5):517-21.
16. Garrity ER, Jr., Mehra MR: An update on clinical outcomes in heart and lung transplantation. *Transplantation* 2004; 77(9 Suppl):S68-74
17. Gaston RS, Alveranga DY, Becker BN, Distant DA, Held PJ, Bragg-Gresham JL, Humar A, Ting A, Wynn JJ, Leichtman AB: Kidney and pancreas transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3 Suppl 4:64-77
18. Chang EN, Scudamore CH, Chung SW: Transplantation: focus on kidney, liver and islet cells. *Can J Surg* 2004; 47(2):122-9
19. Tullius SG, Hancock WW, Heemann U, Azuma H, Tilney NL: Reversibility of chronic renal allograft rejection. Critical effect of time after transplantation suggests both host immune dependent and independent phases of progressive injury. *Transplantation* 1994; 58(1):93-9
20. Nadasdy T, Kemeny E, Krenacs T, Csajbok E, Szenohradzky P, Stiller D, Ormos J: [Pathomechanism of the development of chronic obliterative transplantation arteriopathy in human kidney allografts]. *Morphol Igazsagugyi Orv Sz* 1990; 30(3):208-19
21. Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A: Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991; 251(4991):313-6

22. Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB: Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989; 244(4902):339-43
23. Sefton BM, Taddie JA: Role of tyrosine kinases in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(3):372-9
24. Hatada MH, Lu X, Laird ER, Green J, Morgenstern JP, Lou M, Marr CS, Phillips TB, Ram MK, Theriault K, et al.: Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 1995; 377(6544):32-8
25. Clipstone NA, Crabtree GR: Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357(6380):695-7
26. Sloan-Lancaster J, Allen PM: Significance of T-cell stimulation by altered peptide ligands in T cell biology. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(1):103-9
27. Lang TJ, Nguyen P, Peach R, Gause WC, Via CS: In vivo CD86 blockade inhibits CD4+ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8+ T cell activation and CTL effector function. *J Immunol* 2002; 168(8):3786-92
28. Azuma M, Phillips JH, Lanier LL: CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol* 1993; 150(4):1147-59
29. Womer KL, Vella JP, Sayegh MH: Chronic allograft dysfunction: mechanisms and new approaches to therapy. *Semin Nephrol* 2000; 20(2):126-47
30. Denton MD, Magee CC, Sayegh MH: Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 1999; 353(9158):1083-91
31. Dong VM, Womer KL, Sayegh MH: Transplantation tolerance: the concept and its applicability. *Pediatr Transplant* 1999; 3(3):181-92
32. Johnson BD, Konkol MC, Truitt RL: CD25+ immunoregulatory T-cells of donor origin suppress alloreactivity after BMT. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8(10):525-35
33. Parkman R: The biology of bone marrow transplantation for severe combined immune deficiency. *Adv Immunol* 1991; 49:381-410
34. Strand V: Monoclonal antibodies and other biologic therapies. *Lupus* 2001; 10(3):216-21
35. Aw MM: Transplant immunology. *J Pediatr Surg* 2003; 38(9):1275-80

36. Chatenoud L, Bach JF: Therapeutic monoclonal antibodies in transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25(1 Pt 1):473-4
37. Campos HH, Bach JF, Chatenoud L: Devising murine models to better adapt clinical protocols: sequential low-dose treatment with anti-CD3 and anti-CD4 monoclonal antibodies to prevent fully mismatched allograft rejection. *Transplant Proc* 1993; 25(1 Pt 1):798-9
38. Najafian N, Sayegh MH: CTLA4 Ig: a novel immunosuppressive agent. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9(9):2147-57
39. Yu LX, Shan HT, Fu SJ, Du CF, Ma JJ, Xu J, Deng WF, Wang YB: [Clinical study of tacrolimus in postoperative treatment of patients with renal transplantation for diabetic end-stage renal disease]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003; 23(11):1146-8
40. Youhua Z, Zhinlian M, Liming W: Clinical study of FK 506 in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2000; 32(7):1704
41. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66(4):807-15
42. Kunz J, Hall MN: Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem Sci* 1993; 18(9):334-8
43. Vella JP, Sayegh MH: Interactions between cyclosporine and newer antidepressant medications. *Am J Kidney Dis* 1998; 31(2):320-3
44. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA: FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992; 357(6380):692-4
45. Bierer BE, Hollander G, Fruman D, Burakoff SJ: Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr Opin Immunol* 1993; 5(5):763-73
46. Schreiber SL: Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991; 251(4991):283-7
47. Schreiber SL, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992; 13(4):136-42

48. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A: The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1498(1):1-18
49. Van Rijen MM, Metselaar HJ, Hommes M, Ijzermans JN, Tilanus HW, Kwekkeboom J: Mycophenolic acid is a potent inhibitor of the expression of tumour necrosis factor- and tumour necrosis factor-receptor superfamily costimulatory molecules. *Immunology* 2003; 109(1):109-16
50. Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ: Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(3):222-32
51. Coppo R, Amore A: New perspectives in treatment of glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol* 2003
52. Dupont P, Warrens AN: The evolving role of sirolimus in renal transplantation. *Qjm* 2003; 96(6):401-9
53. Fung J, Marcos A: Rapamycin: friend, foe, or misunderstood? *Liver Transpl* 2003; 9(5):469-72
54. Yang J, Furie BC, Furie B: The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999; 81(1):1-7
55. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL: The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997; 99(11):2682-90.
56. McEver RP, Cummings RD: Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100(11 Suppl):S97-103.
57. Kumar A, Villani MP, Patel UK, Keith JC, Jr., Schaub RG: Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation* 1999; 99(10):1363-9
58. Morgan A, Jones ND, Nesbitt AM, Chaplin L, Bodmer MW, Emtage JS: The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology* 1995; 86(2):319-24

59. Khor SP, McCarthy K, DuPont M, Murray K, Timony G: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, allometry, and dose selection of rPSGL-Ig for phase I trial. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293(2):618-24
60. Salama AD, Sayegh MH: Alternative T-cell costimulatory pathways in transplant rejection and tolerance induction: hierarchy or redundancy? *Am J Transplant* 2003; 3(5):509-11
61. Rothstein DM, Sayegh MH: T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunol Rev* 2003; 196:85-108
62. Kishimoto K, Dong VM, Sayegh MH: The role of costimulatory molecules as targets for new immunosuppressives in transplantation. *Curr Opin Urol* 2000; 10(2):57-62
63. Sharpe AH, Freeman GJ: The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(2):116-26
64. Abbas AK, Sharpe AH: T-cell stimulation: an abundance of B7s. *Nat Med* 1999; 5(12):1345-6
65. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB: T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(3):220-8
66. Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC: The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2001; 2(3):203-9
67. Mueller DL: T cells: A proliferation of costimulatory molecules. *Curr Biol* 2000; 10(6):R227-30
68. Freeman GJ, Gray GS, Gimmi CD, Lombard DB, Zhou LJ, White M, Fingerth JD, Gribben JG, Nadler LM: Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J Exp Med* 1991; 174(3):625-31
69. Freeman GJ, Borriello F, Hodes RJ, Reiser H, Gribben JG, Ng JW, Kim J, Goldberg JM, Hathcock K, Laszlo G, et al.: Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med* 1993; 178(6):2185-92
70. Chambers CA: The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 2001; 22(4):217-23

71. Green JM: The B7/CD28/CTLA4 T-cell activation pathway. Implications for inflammatory lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22(3):261-4
72. Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R: Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994; 1(9):793-801
73. Bugeon L, Dallman MJ: Costimulation of T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4 Pt 2):S164-8
74. Salazar-Fontana LI, Bierer BE: T-lymphocyte coactivator molecules. *Curr Opin Hematol* 2001; 8(1):5-11
75. Alegre ML, Shiels H, Thompson CB, Gajewski TF: Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 1998; 161(7):3347-56
76. Alegre ML, Noel PJ, Eisfelder BJ, Chuang E, Clark MR, Reiner SL, Thompson CB: Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol* 1996; 157(11):4762-70
77. Gross JA, St John T, Allison JP: The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J Immunol* 1990; 144(8):3201-10
78. Boulougouris G, McLeod JD, Patel YI, Ellwood CN, Walker LS, Sansom DM: Positive and negative regulation of human T cell activation mediated by the CTLA-4/CD28 ligand CD80. *J Immunol* 1998; 161(8):3919-24
79. Viola A, Lanzavecchia A: T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996; 273(5271):104-6
80. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zhang W, Straus D, Samelson LE, Thompson CB, Bluestone JA: Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 1998; 282(5397):2263-6
81. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH: Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3(5):541-7
82. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW: Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtlA-4. *Science* 1995; 270(5238):985-8

83. Hancock WH, Whitley WD, Tullius SG, Heemann UW, Wasowska B, Baldwin WM, 3rd, Tilney NL: Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56(3):643-50
84. Gasser M, Waaga-Gasser AM, Grimm MW, Grimm MR, Lenhard SM, Kist-Van Holthe JE, Laskowski I, Shaw GD, Thiede A, Hancock WW, Tilney NL: Selectin blockade of initial inflammatory events plus low-dose Sirolimus/CsA prevents chronic rejection of kidneys from brain dead donors. *Am J Transplant* 2004 (in press)
85. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32(2):219-29
86. Verhaert P, Marivoet S, Vandesande F, De Loof A: Localization of CRF immunoreactivity in the central nervous system of three vertebrate and one insect species. *Cell Tissue Res* 1984; 238(1):49-53
87. Sternberger LA: The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. *J Histochem Cytochem* 1979; 27(12):1657
88. Kelly PA, Gruber SA, Behbod F, Kahan BD: Sirolimus, a new, potent immunosuppressive agent. *Pharmacotherapy* 1997; 17(6):1148-56
89. Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM: Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 1996; 50(4):1089-100
90. Cummings RD: Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(5):519-28
91. Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, von Andrian UH: Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science* 1996; 273(5272):252-5
92. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-9

93. Norman KE, Katopodis AG, Thoma G, Kolbinger F, Hicks AE, Cotter MJ, Pockley AG, Hellewell PG: P-selectin glycoprotein ligand-1 supports rolling on E- and P-selectin in vivo. *Blood* 2000; 96(10):3585-91
94. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S: High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med* 1995; 333(6):333-6
95. Walker LM, York JL, Imam SZ, Ali SF, Muldrew KL, Mayeux PR: Oxidative stress and reactive nitrogen species generation during renal ischemia. *Toxicol Sci* 2001; 63(1):143-8
96. Yoshimura T, Kawashima M, Nakamura T, Isowa N, Bando T, Hasegawa S, Kondo H, Toyokuni S, Wada H: A novel selectin blocker alleviates oxidative stress of lung reperfusion injury. *J Surg Res* 2001; 101(1):91-8
97. Arita K, Uozumi T, Oki S, Kurisu K, Ohtani M, Mikami T: The function of the hypothalamo-pituitary axis in brain dead patients. *Acta Neurochir (Wien)* 1993; 123(1-2):64-75
98. Sugimoto T, Sakano T, Kinoshita Y, Masui M, Yoshioka T: Morphological and functional alterations of the hypothalamic-pituitary system in brain death with long-term bodily living. *Acta Neurochir (Wien)* 1992; 115(1-2):31-6
99. Amado JA, Lopez-Espadas F, Vazquez-Barquero A, Salas E, Riancho JA, Lopez-Cordovilla JJ, Garcia-Unzueta MT: Blood levels of cytokines in brain-dead patients: relationship with circulating hormones and acute-phase reactants. *Metabolism* 1995; 44(6):812-6
100. Fassbender K, Rossol S, Kammer T, Daffertshofer M, Wirth S, Dollman M, Hennerici M: Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci* 1994; 122(2):135-9
101. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD: P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000; 191(8):1413-22
102. Pratschke J, Kofla G, Wilhelm MJ, Vergopoulos A, Laskowski I, Shaw GD, Tullius SG, Volk HD, Neuhaus P, Tilney NL: Improvements in early behavior

- of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor. *Ann Surg* 2001; 234(6):732-40
103. Gonzalo JA, Delaney T, Corcoran J, Goodearl A, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ: Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 2001; 166(1):1-5
 104. Tamura H, Dong H, Zhu G, Sica GL, Flies DB, Tamada K, Chen L: B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood* 2001; 97(6):1809-16
 105. von Andrian UH, Mackay CR: T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000; 343(14):1020-34.
 106. Tilney NL, Guttman RD: Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation* 1997; 64(7):945-7
 107. Cecka JM: The UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 2002:1-20
 108. Kahan BD, Podbielski J, Napoli KL, Katz SM, Meier-Kriesche HU, Van Buren CT: Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. *Transplantation* 1998; 66(8):1040-6
 109. Groth CG, Backman L, Morales JM, Calne R, Kreis H, Lang P, Touraine JL, Claesson K, Campistol JM, Durand D, Wramner L, Brattstrom C, Charpentier B: Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 1999; 67(7):1036-42
 110. Kahan BD: Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000; 356(9225):194-202
 111. Stepkowski SM, Napoli KL, Wang ME, Qu X, Chou TC, Kahan BD: Effects of the pharmacokinetic interaction between orally administered sirolimus and cyclosporine on the synergistic prolongation of heart allograft survival in rats. *Transplantation* 1996; 62(7):986-94
 112. MacDonald AS: A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute

- rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001; 71(2):271-80
113. Johnson RW, Kreis H, Oberbauer R, Brattstrom C, Claesson K, Eris J: Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure. *Transplantation* 2001; 72(5):777-86
114. Podder H, Stepkowski SM, Napoli KL, Clark J, Verani RR, Chou TC, Kahan BD: Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(5):1059-71
115. Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD, Vanrenterghem Y, Neylan J: Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: a phase II trial. Rapamune Study Group. *Transplantation* 1999; 68(10):1526-32
116. Avlonitis VS, Fisher AJ, Kirby JA, Dark JH: Pulmonary transplantation: the role of brain death in donor lung injury. *Transplantation* 2003; 75(12):1928-33
117. McEver RP, Cummings RD: Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100(3):485-91
118. Sako D, Comess KM, Barone KM, Camphausen RT, Cumming DA, Shaw GD: A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell* 1995; 83(2):323-31
119. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C: Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 1999; 93(3):876-85