

Aus dem
CharitéCentrum für Innere Medizin und Dermatologie (CC12)
Institut für Medizinische Immunologie
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk

Diagnostik und Therapie der Transplantatqualität

Habilitationsschrift zur Erlangung der *Venia legendi* für das Fach Immunologie

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Katja Kotsch,
geboren am 28. April 1969 in Berlin

Dekanin: Prof. Dr. A. Grüters-Kieslich
Präsident: Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Geissler
2. Gutachter: Prof. Dr. D. Kabelitz

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2008

Alles kommt in der Wissenschaft auf ein Gewährwerden dessen an, was den Erscheinungen zu Grunde liegt. Ein solches Gewährwerden ist bis ins Unendliche fruchtbar.

Johann Wolfgang von Goethe (1749 - 1832)

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	Seite 4
2.	RISIKOFAKTOREN DER TRANSPLANTATDYSFUNKTION	Seite 7
3.	ALLOANTIGEN-ABHÄNGIGE RISIKOFAKTOREN	Seite 8
3.1.	Akute zelluläre Abstoßung	Seite 9
3.2.	Immunmonitoring der akuten zellulären Abstoßung	Seite 12
3.3.	Bedeutung der KIR/HLA Liganden Kompatibilität	Seite 17
4.	ALLOANTIGEN-UNABHÄNGIGE RISIKOFAKTOREN	Seite 19
4.1.	Diagnostik und Therapie des Ischämie/-Reperfusionsschadens	Seite 19
4.2.	Einfluss des Spender-Hirntodes auf Ischämie/Reperfusionsschaden und akute Abstoßungsreaktionen	Seite 25
4.3.	Therapeutische Ansätze zur Verbesserung der Transplantatqualität nach Spender-Hirntod	Seite 28
5.	ZUSAMMENFASSUNG	Seite 31
6.	REFERENZEN	Seite 35
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	Seite 47
8.	DANKSAGUNG	Seite 48
9.	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	Seite 49

Zusammenfassung

Zentraler Aspekt der eigenen Arbeiten war die Analyse definierter Alloantigen-abhängiger sowie Alloantigen-unabhängiger Risikofaktoren auf das Transplantatüberleben. Zu den Alloantigen-abhängigen Risikofaktoren zählt das Auftreten einer akuten zellulären Abstoßung post Transplantation. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein konsequentes Monitoring definierter Kandidatenmarker im Urin nierentransplanter Patienten die Vorhersage einer akuten zellulären Rejektion erlaubt. Ferner konnte die Bedeutung der Inkompatibilität zwischen den polymorphen *killer-cell immunoglobulin-like* Rezeptoren und ihren korrespondierenden HLA Liganden für das Risiko einer akuten Abstoßung nach allogener Nierentransplantation identifiziert werden. In weiterführenden Untersuchungen wurde hinsichtlich Alloantigen-unabhängiger Risikofaktoren der Einfluss des Ischämie-Reperfusionsschadens und des Spenderhirntods analysiert. Neben der Identifikation potentieller Kandidatenmarker für eine Transplantatschädigung wurden neue therapeutische Ansätze in experimentellen als auch klinischen Ansätzen überprüft. Zusammengefasst betrachtet konnten die vorliegenden Untersuchungen einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Pathogenese, Diagnostik und Therapie einzelner Risikofaktoren für das Langzeitüberleben bei der soliden Organtransplantation leisten.

1. Einleitung

Die solide Organtransplantation hat sich innerhalb der vergangenen 30 Jahre zu einer etablierten therapeutischen Methode bei irreversiblen und terminalen Organschäden entwickelt. Die moderne Geschichte der Organtransplantation begann 1954 mit der ersten erfolgreichen Nierentransplantation, die durch Joseph Murray in Boston, U.S.A. zwischen eineiigen Zwillingen durchgeführt wurde (MERILL et al. 1956). Dieses Ereignis zog eine Reihe erfolgreicher klinischer Transplantationen nach sich. So erfolgte 1967 durch Thomas E. Starzl die erste Lebertransplantation und im gleichen Jahr unter der Leitung von Christiaan N. Barnard die erste Herztransplantation (BARNARD 1968; STARZL et al. 1969).

Eine Transplantation kann die Lebensqualität der betroffenen Patienten maßgeblich verbessern. Insbesondere die Nierentransplantation hat sich als Ersatztherapie gegenüber der Dialyse durchgesetzt. Von ihren Anfängen im Jahre 1954 mit zunächst unbefriedigenden Ergebnissen (80% Transplantatverlust im ersten Jahr nach postmortaler Nierenspende) hat sie sich drastisch weiter entwickelt. Derzeit werden 1-Jahres-Transplantatüberlebensraten von 85% (postmortale Organspende) bis zu 95% (Lebendspende) erreicht (UNOS 2000). Neben der Entwicklung chirurgischer Operationstechniken sowie verbesserter postoperativer Behandlungskonzepte ist es vor allem der Entdeckung potenter Immunsuppressiva zu verdanken, dass die Organtransplantation erfolgreich in der klinischen Routine etabliert werden konnte. Dabei stellt die Einführung von Cyclosporin A (CsA) Ende der 70er Jahre einen der Meilensteine für die schnelle Zunahme erfolgreicher Organtransplantationen in den darauf folgenden Jahren dar (MULTICENTER TRIAL 1982). Durch die Implementierung des gegen das T-Zellantigen CD3 gerichteten monoklonalen Antikörpers (OKT3) und weiterer verbesserter immunsuppressiver Regime in den neunziger Jahren konnte das Auftreten akuter Rejektionsereignisse erfolgreich verringert werden (COSIMI et al. 1981; DENTON et al. 1999). Eine konsequente ambulante Überwachung Patienten in Verbindung mit einer differenzierten Anwendung aktuell verfügbarer Immunsuppressiva konnte zu weiteren Fortschritten in der Anwendung und im Erfolg der Organtransplantation beitragen. So wurden im Versorgungsgebiet von Eurotransplant im Jahre 2005 insgesamt 3.406 Nieren-, 1.364 Leber-, 563 Herz-, 839 Lungen- und 304 Pankreastransplantationen durchgeführt (EUROTRANSPLANT 2005). Allerdings stellt der zunehmende Verlust von Organtransplantaten nach Monaten bis Jahren eines der herausragenden Probleme in der Transplantationsmedizin dar. So bildet die chronische Rejektion die Hauptursache für den

späten Verlust der transplantierten Niere mit einer Inzidenz von 3 - 5% p.a. (CECKA 1999; PASCUAL et al. 2002).

Für eine Organtransplantation werden größtenteils Leichentransplantate, d.h. Organe hirntoter Spender verwendet. Aufgrund des bestehenden Spender- und daraus resultierenden Organmangels stagnieren jedoch die jährlich durchgeführten Transplantationen in den letzten Jahren und sind sogar tendenziell rückläufig (DSO 2006). Da einerseits die Indikationen für eine Transplantation hinsichtlich einer zunehmenden Akzeptanz in den letzten Jahren großzügiger gestellt werden, andererseits jedoch die Bereitschaft zur Organspende in der Bevölkerung unvermindert niedrig ist, wird die Diskrepanz zwischen verfügbaren Organen und Patienten immer größer. In Deutschland warteten 2006 ca. 8.473 Patienten auf eine neue Niere. Dahingegen wurden aber nur 2.776 Organe transplantiert, wovon der Anteil der Lebendnierenspenden ca. 18,8% betrug (DSO 2006). Die Einstellung der Bevölkerung zur Organspende lässt nicht erwarten, dass sich die Situation des Organmangels in absehbarer Zukunft verbessern wird. Lebendspenden von Nieren und zunehmend auch von Lebern erreichen zumindest im Gebiet von Eurotransplant aktuell keine ausreichend hohe Frequenz, um den bestehenden Bedarf zu decken. Eine Zunahme der Mortalitätsrate auf den Wartelisten ist die Folge.

Um die steigende Nachfrage nach Transplantaten zu befriedigen, werden zunehmend Organe mit erweiterten Spenderkriterien, sogenannte marginale Organe (ältere Leichenspende, längere Ischämiezeiten, organische Vorschäden), akzeptiert (TULLIUS et al. 2001). Statistische Analysen und tierexperimentelle Daten belegen, dass nach einer Nierentransplantation Organe älterer Spender eine höhere Abstoßungswahrscheinlichkeit haben, wobei eine erhöhte Sensibilität gegen hirntod- und ischämiebedingter Schädigung, ein vermindertes Regenerationsvermögen sowie der Einfluss von Vorschädigungen (Vaskulopathien, etc.) als ursächlich diskutiert werden (CHERTOW et al. 1995; HARIHARAN et al. 1997; TAKADA et al. 1998; PRATSCHKE et al. 2001). Ähnliches wurde für Organe von hypertensiven Spendern beschrieben (LEE et al. 1998; CARTER et al. 2000). Jedoch ist dieses Problem nicht ausschließlich auf Nierentransplantate beschränkt, da ähnliche, wenngleich weniger intensiv untersuchte Daten für „Fettlebertransplantate“ und marginale Herztransplantate berichtet wurden (LIVI et al. 1994; SCHEMMER et al. 1999). Um die Komplexität der "Organqualität" besser verstehen und untersuchen zu können, wurde in den letzten Jahren in experimentellen Tiermodellen die Bedeutung einzelner Risikofaktoren getrennt und systematisch analysiert. Diese Studien zeigen eindeutig, dass sowohl die Ausprägung der

Ischämie/Reperfusion als auch Spenderfaktoren wie Hirntod, Alter und Bluthochdruck einen deutlichen Einfluss auf das Langzeitüberleben der Nierentransplantate haben (TULLIUS et al. 2001). Die gemeinsame Auswirkung aller Risikofaktoren ist eine erhöhte Entzündungsreaktion im Transplantat, assoziiert mit einer akzelerierten chronischen Transplantatdysfunktion. Es zeigt sich, dass weniger die direkte Schädigung der parenchymalen Funktion die Ursache einer schlechteren Prognose ist, sondern vielmehr eine erhöhte Immunogenität des vorgeschädigten Transplantates, die zu einer akzelerierten Alloreaktivität führt. Diese Beobachtung erklärt weiterhin, dass HLA Disparitäten in den statistischen Patientenanalysen bei der Leichenspende eine größere Rolle als bei der Lebendspende spielen, da der immunologische Unterschied bei der Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen (APC) des Spenders (Leichenspenderniere: längere Ischämie, zumeist ältere Spender, Ko-morbidität, etc.) mehr zur Geltung kommt. Es deutet sich an, dass eine erhöhte Immunogenität durch die Aktivierung u.a. von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und der damit verbundenen Infiltration von T-Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen hervorgerufen wird und somit wichtiger erscheint als hypoxische „Organschäden“. Dabei konnte eine erhöhte Spenderalter-abhängige Rate alloreaktiver T-Zellen, eine erhöhte Expression von T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) assoziierten Zytokinen sowie eine erhöhte Rate infiltrierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der frühen Phase nach Transplantation von älteren Organen in jüngere Empfängertiere detektiert werden. Der Einfluss einer ischämischen Schädigung erlangt insbesondere bei marginalen Donororganen (z.B. hohes Spenderalter) fundamentale Bedeutung, da von einer verbesserten Transplantatfunktion bei z.B. älteren Spenderorganen bei gleichzeitig verkürzter Ischämie ausgegangen werden kann. So konnte in einer experimentellen Untersuchung ein synergistisches Verhältnis einer verlängerten Ischämiezeit bei erhöhtem Spenderalter gezeigt werden (TULLIUS et al. 2000). Weitere experimentelle Untersuchungen zeigten eindrucksvolle Verbesserungen nach einer anti-inflammatorischen Vorbehandlung der Spender (REUTZEL-SELKE et al. 2003).

Unter dem Druck eines immer größer werdenden Spenderbedarfes besteht zunehmend die Tendenz, die Entscheidung zu Gunsten der Nutzung marginaler Organe zu treffen. Weiterhin konnten aufgrund des Einsatzes verbesserter Immunsuppressiva die Transplantatergebnisse in den letzten 10 Jahren trotz "schlechterer" Organqualität verbessert werden, wodurch die Grenzen der Transplantatauswahl neu determiniert werden können. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutsamkeit der Definition objektiver Parameter zur individuellen Beurteilung der "Organqualität", woran es derzeit weitgehend mangelt. Besonders wichtig wären hierbei geeignete Marker im Spender. Da

die Vorschädigung des Spenderorgans die Immunogenität des Transplantates mitbestimmt, spielt die spezifische Empfängerreaktion auf das transplantierte Organ eine wesentliche Rolle für die Langzeitprognose, so dass der Frühphase der Entzündungsreaktion eine große prognostische Rolle zuteil wird. Dies beinhaltet den Nachteil, dass die Transplantation bereits erfolgte und für ein gutes Langzeitergebnis nur eine selektive, der spezifischen Situation angepasste, Immuntherapie für den Patienten in Frage kommt.

2. Risikofaktoren der Transplantatdysfunktion

Eine progrediente Funktionseinschränkung, die Monate bis Jahre nach der Transplantation auftritt und schließlich zum Funktionsverlust des Transplantats führt, wird üblicherweise als chronische Abstoßung oder chronische Transplantatnephropathie (engl.: *chronic allograft nephropathy*, CAN), bzw. chronische Transplantatvaskulopathie bezeichnet. Während sich Diagnostik, Prophylaxe und Therapie der klinisch "sichtbaren" akuten Rejektion, einer plötzlicher Verschlechterung der Organfunktion als direkte Konsequenz der Immunantwort auf das Spenderorgan, in den letzten Jahren deutlich verbessert haben, steckt die Früherkennung und Therapie der chronischen Abstoßung noch in den Anfängen. Als pathophysiologisches Konzept zur Erklärung der Vorgänge wird ein multifaktorielles Geschehen, bestehend aus Alloantigen-spezifischen und Alloantigen-unspezifischen Einflüssen diskutiert (TULLIUS et al. 1995). Einen wesentlichen Risikofaktor für chronische Abstoßungen stellen immunologisch vermittelte Prozesse der ersten Wochen oder Monate nach der Transplantation dar. Nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen führen sowohl klinisch "sichtbare" akute (Funktionsverschlechterung), als auch subklinisch akute (ohne erkennbare Funktionsverschlechterung) Rejektionen in der Frühphase nach einer Transplantation zu einer erhöhten Inzidenz von sich innerhalb des ersten Jahres nach einer Transplantation manifestierenden ersten Zeichen einer chronischen Rejektion, die letztendlich zu einer Funktionseinschränkung bis hin zum Transplantatsverlust führen.

Morphologisch sind klare Unterscheidungskriterien für akute und chronische Transplantatabstoßungen definiert: Während ausgeprägte, zelluläre Infiltrate sowie ödematöse und nekrotische Veränderungen als morphologisches Korrelat akuter Abstoßungsreaktionen charakterisiert werden können, lassen sich die morphologischen Merkmale der chronischen Transplantatabstoßung eher als proliferative Veränderungen beschreiben. Eine persistierende, zunächst gering ausgeprägte, zelluläre Infiltration, verbunden mit einer Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und der

Freisetzung chemotaktischer Faktoren führt zu einer zunehmenden zellulären Infiltration. Die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verstärkt die Endothel- und Fibroblastenaktivierung, die schließlich zu den organspezifischen Veränderungen führt (TILNEY et al. 1991; TULLIUS & TILNEY 1995). Frühe unspezifische Schäden als Folge des Ischämie-/Reperfusionsschadens oder in Folge des Hirntodes (PRATSCHKE et al. 2001) sind hierbei zumindest mitverantwortlich für die Langzeitschäden. So werden die Zusammenhänge zwischen der adaptiven Immunantwort einhergehend mit unspezifischen Schädigungen, z.B. Aktivierung von Toll-like Rezeptoren, in jüngster Zeit zunehmend besser verstanden (TESAR & GOLDSTEIN 2007). Eine initiale Schädigung des Endothels, verursacht durch unspezifisch inflammatorische oder Alloantigen-spezifische Faktoren (akute Abstoßungen/HLA-Kompatibilität), scheint sowohl bei der Nieren-, als auch bei der Herztransplantation, eine entscheidende Rolle für eine spätere Transplantatschädigung zu spielen (LIPPY & TANAKA 1994; RUSH et al. 1999). Die besondere Rolle unspezifisch schädigender Faktoren wird eindrucksvoll in der klinischen Nierentransplantation dokumentiert: Eine annähernd gleiche 3-Jahresfunktion von HLA-identischen und nicht-verwandten Lebendtransplantationen sowie die wesentlich günstigeren Langzeitergebnisse von Lebend- versus Leichenspenden spiegelt diese Situation wider (TERASAKI et al. 1995; HARIHARAN et al. 2000). Ferner scheinen HLA-Antikörper eine kausale Rolle für die Entstehung der chronischen Transplantatdysfunktion zu spielen (JOOSTEN et al. 2003; TERASAKI 2003). Die Ergebnisse einer prospektiven Studie zeigen eine signifikante Häufung von HLA-Antikörpern ein Jahr nach Transplantation bei Patienten mit einem chronischen Transplantatverlust (TERASAKI & OZAWA 2004). Zusammenfassend betrachtet führt die synergistische Steigerung der Alloantigen-abhängigen Immunantwort in Kombination mit Spender-spezifischen Risikofaktoren zu verstärkt auftretenden akuten Abstoßungsepisoden und somit zu einer frühen und akzelerierten Schädigung des Organs.

3. Alloantigen-abhängige Faktoren

Die Bedeutung Alloantigen-abhängiger Faktoren konnte ursprünglich durch das signifikant frühe und ausgeprägte Auftreten der chronischen Organdysfunktion bei Allotransplantaten im Vergleich zu Isotransplantaten demonstriert werden. Dabei schien das Auftreten akuter Abstoßungsreaktionen eine entscheidende Rolle zu spielen (GULANIKAR et al. 1992; ALMOND et al. 1993; BASADONNA et al. 1993). Untersuchungen belegen eine signifikant bessere Langzeitfunktion bei HLA-kompatiblen Spender-/Empfängerpaaren (MORRIS et al. 1999), wobei umfangreiche Registerdaten den signifikanten Einfluss der

Anzahl der HLA Disparitäten (HLA-A, -B und -DR) auf das Transplantatüberleben nach allogener Nierentransplantation belegen (SMITS et al. 1996; HATA et al. 1996; MORRIS et al. 1999). Ergänzend konnte kürzlich ebenfalls gezeigt werden, dass trotz verbesserter Überlebensraten der vergangenen 20 Jahre, der Einfluss der HLA-Kompatibilität nach wie vor signifikant mit dem Auftreten von Rejektionskrisen und Transplantatüberleben assoziiert ist (OPELZ & DOHLER 2007).

3.1. Akute zelluläre Abstoßung

Die Ursache für einen Organverlust in Folge einer Entzündungsreaktion wurde erstmals von Sir Peter Medawar unter dem Begriff „Abstoßungsreaktion“ erwähnt (MEDAWAR 1944; GIBSON & MEDAWAR 1943). So konnten Abstoßungsreaktionen nur dann beobachtet werden, wenn Organe zwischen genetisch verschiedenen Individuen transplantiert wurden (ANDERSON et al. 1954). Hingegen wurden auto- und isogene Transplantationen nicht mit einer Entzündungsreaktion beantwortet und führten zur Organakzeptanz. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von Interaktionen zwischen Empfängerorganismus und Spenderorgan vor allem auf eine genetische Differenz und die damit verbundenen unterschiedlichen zellulären Oberflächenantigene zurückzuführen ist und somit entscheidend vom Grad der genetischen Verwandtschaft zwischen Empfänger und Spender abhängt (GORER 1938).

Die akute immunologische Reaktion auf Fremdgewebe, allogene oder xenogene, stützt sich hauptsächlich auf ein T-zellvermitteltes Geschehen (akute, zelluläre Rejektion), welches meist innerhalb von Tagen bis mehreren Wochen nach Transplantation auftritt. Hierbei kommt es zu einer Infiltration des Allotransplantates von aktivierten T- und B-Lymphozyten, Makrophagen sowie Natürlichen Killerzellen (NK). Dabei basieren die zellvermittelten Effektormechanismen auf der direkten sowie indirekten Alloantigenerkennung durch immunkompetente T-Lymphozyten. Als Initiatoren der Immunantwort gelten, neben MHC Klasse II-tragenden Endothelzellen (AUSTYN & LARSEN 1992), vor allem die Dendritischen Zellen. Diese sind in der Lage, Kofaktoren zu sezernieren und tragen somit zur Aktivierung von alloreaktiven Lymphozyten und somit entscheidend zur Initialisierung der Abstoßungsreaktion bei (HUGHES et al. 1990). Ist die initiale Fremderkennung des transplantierten Organs erfolgt, schließt sich ein durch gegenseitige Aktivierung gekennzeichnetes *Circulus vitiosus* an, der letztendlich zu einer Transplantatzerstörung führt. Durch die Antigen-spezifische Aktivierung erfolgt die Sekretion von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen durch einzelne Lymphozytensubpopulationen. Die Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$

führt zu einer unspezifischen Stimulation von Neutrophilen und Endothelzellen mit anschließender Expression von Adhäsionsmolekülen, z.B. *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) (ADAMS et al. 1989). Vor allem die Sekretion von IL-2 und IFN γ spielt in der Erkennungs- und Aktivierungsphase eine entscheidende Rolle (DALLMANN et al. 2002). Es erfolgt eine massive MHC Expression sowohl auf Endothelzellen als auch auf Parenchymzellen durch IFN γ (DALLMANN 1993). Es scheint, dass die vermehrte Expression von MHC auf Transplantatzellen die Immunogenität des Transplantates potenziert und somit die weitere zelluläre Immunantwort getriggert wird (TILNEY et al. 1993), so dass eine Korrelation zwischen der MHC-Dichte und dem histologischen Abstoßungsgrad besteht (SHOSKES et al. 1990; SHOSKES & HALLORAN 1991). Die Produktion von chemotaktischen Zytokinen und Chemokinen resultiert in einer weiteren selektiven Rekrutierung von T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen. Mittlerweile ist gut dokumentiert, dass insbesondere CD4⁺ Helferzellen für die Initiierung der primären Antwort gegen das Allograft verantwortlich sind (HEEGER 2003). Ferner begünstigen in das Transplantat rekrutierte zytotoxische CD8⁺ Zellen den Abstoßungsprozess, indem sie Endothel- und Parenchymzellen durch zytotoxische Effektorfunktionen, wie z.B. die Sezernierung des porenbildenden Perforins sowie anhand der Freisetzung von Granzymen (Granzym A/B) schädigen (COLONNA et al. 1993, PIPKIN & LIEBERMANN 2007). Infiltrierende allostimulierte B-Zellen differenzieren in Antikörper-produzierende Plasmazellen und sekretieren spezifische als auch unspezifische anti-Donor-Antikörper (HÄYRY et al. 1984).

Humorale Abstoßungsmechanismen spielen, neben ihrer überragenden Bedeutung bei Transplantationen von gegen Spender MHC vorsensibilisierten Empfängern, eine bedeutende Rolle bei der akuten sowie chronischen allogenen Abstoßungsreaktion. Dabei lässt sich die akute humorale/vaskuläre Form der Abstoßung in der Nierentransplantation pathologisch durch das Vorhandensein des Komplementspaltproduktes C4d, Neutrophiler in den Kapillaren, einer arteriellen, fibrinoiden Nekrose und akuter, tubulärer Gewebsschädigung sowie durch das Vorkommen zirkulierender anti-Donor MHC-spezifischer Antikörper charakterisieren (MAUIYYEDI et al. 2002). Die primäre Angriffsfläche bei der humoralen Abstoßungsreaktion stellen die Endothelzellen dar (RYAN 1986; DAVIES & HAGEN 1993), wobei als auslösendes Ereignis bei der Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion die Bindung von Komplement-aktivierenden Antikörpern an endotheliale Oberflächenstrukturen gilt. Antikörper- und Komplementreaktion induzieren eine Abfolge von Veränderungen im Endothel des Transplantates, welche zur Aktivierung und nachfolgender Zytolyse der Endothelzelle führen.

Die akute Rejektion und deren Therapie stellen ein Kernproblem der Organtransplantation dar. Obwohl die Inzidenz akuter Rejektionsepisoden nach allogener Nierentransplantation aufgrund verbesserter Immunsuppressiva und einer intensiven klinischen Betreuung immer weiter reduziert wird, gefährdet jede durchlittene Abstoßung die Langzeitfunktion des Allotransplantats und ist somit ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Dysfunktion im Langzeitverlauf (ALMOND et al. 1993). Bei der Nierentransplantation sind sowohl klinische Zeichen (Rückgang der Diurese, Blutdruckanstieg, Transplantatschmerz, Fieber, Gewichtszunahme) als auch laborchemische (Serumkreatinin) sowie histologische (Biopsie) Befunde mögliche Merkmale einer Rejektion. Die Entnahme einer Biopsie für eine feingewebliche Diagnostik ist nicht nur teuer und zeitaufwändig, sie kann auch zu klinischen Komplikationen führen. Ferner wird sie zu einem Zeitpunkt durchgeführt, an dem das Transplantat schon eine Gewebeschädigung erlitten hat. Rejektionen unter dem jeweiligen immunsuppressiven Regime können ohne Symptome verlaufen. Jene subklinische Rejektionen werden zwar histologisch diagnostiziert, hingegen ist klinisch keine renale Dysfunktion zu verzeichnen (RUSH et al. 1996). Dabei ist das Auftreten subklinischer Abstoßungen durch infiltrierende Lymphozyten, aktivierte Makrophagen und weitere inflammatorische Mediatoren gekennzeichnet. Unbehandelte subklinische Rejektionen resultieren in permanente tubulo-interstitielle Gewebeschädigungen sowie in eine eingeschränkte Transplantatfunktion und ein beschränktes Transplantatüberleben (NANKIVELL et al. 2001; RUSH et al. 1996; RUSH et al. 1998). Die Identifikation von potenziellen Biomarkern gewinnt folglich für eine nicht-invasive Diagnostik einer Transplantatfunktionsverschlechterung zunehmend an Bedeutung in der Transplantationsmedizin. Jene Marker könnten die Basis für zukünftige Diagnostika und Monitoringstrategien bilden, in dem sie hohe Sensitivitäten und Spezifitäten mit einem hohen prädiktiven Wert aufweisen und ihre Analyse das nicht-invasive Monitoring von Patienten während der stationären als auch ambulanten Phase erlaubt. Das Ziel dieser Tests sollte dabei ein optimales Kosten/Nutzen/Risiko-Verhältnis für die Identifikation von Patienten mit erhöhtem Risiko für eine akute sowie subklinisch akute Rejektion sein.

3.2. Immunmonitoring der akuten zellulären Abstoßung

Die Implementation molekularer Methoden hat sich als hilfreich für die Diagnostik, das Monitoring sowie für die Aufklärung funktioneller Mechanismen bei der Transplantation erwiesen. So konnten mittels Genexpressionsanalysen unter Verwendung der real-time RT-PCR diverse Kandidatenmarker in Biopsaten, peripherem Blut oder in Urin identifiziert werden, welche mit dem Auftreten einer akuten zellulären Abstoßung assoziiert werden konnten (SHARMA et al. 1996; ODE-HAKIM et al. 1996; STREHLAU et al. 1997; VASCONCELLOS et al. 1998; PAVLAKIS et al. 1999; NICKEL et al. 2001; MUTHUKUMAR et al. 2003; DING et al. 2003). Insbesondere die Induktion der zytotoxischen Effektormoleküle Granzym B und Perforin in Biopsien von Nierentransplantaten konnte mit akuten Abstoßungskrisen korreliert werden (SABEK et al. 2002), deren Nachweis auch im Urinzellsediment gelang (Li et al. 2001). In der Nierentransplantation bietet der Urin eine hervorragende Alternative, um nicht-invasiv Informationen über den Status des Transplantates zu erhalten. Unsere eigenen kinetischen Untersuchungen im Urinzellsediment nierentransplantierte Patienten belegen, dass insbesondere die mRNA Induktion des zytotoxischen Moleküls Granulysin sowie des T-Zellmarkers CD3 signifikant in 11/14-Patienten mit einer frühen (<10 Tage post Transplantation) sowie mit einer verzögerten akuten zellulären Rejektion (>20 Tage post Transplantation) assoziiert ist (100% Spezifität, 80% Sensitivität). Hingegen zeigte die Analyse bislang dokumentierter Effektormoleküle wie Granzym B, Perforin oder FasL eine wesentlich geringere Sensitivität und Spezifität. Ähnlich wie Granzym B und Perforin ist Granulysin ein zytolytisches Protein, welches konstitutiv von zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird. Im Gegensatz zu Granzym B induziert Granulysin einen Caspase-unabhängigen Zelltod und wirkt u.a. antimikrobiell (PENA & KRENSKY 1997). Die generierten Daten verdeutlichen den prädiktiven, diagnostischen Aussagewert von CD3 und insbesondere von Granulysin im Urinzellsediment, welcher auf die Infiltration von zytotoxischen CD8+ T Zellen in das Allotransplantat hinweist, bevor eine klinische Manifestation der akuten Abstoßung zu verzeichnen ist.

K. Kotsch, M.-F. Mashreghi, G. Bold, P. Tretow, J. Beyer, M. Matz, J. Hoerstrup, J. Pratschke, R. Ding, M. Suthanthiran, H.-D. Volk, and P. Reinke. *Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment predicts early and delayed acute renal allograft rejection. Transplantation, 2004; 27;77(12):1866-75.*

Ein weiterer interessanter Kandidatenmarker für das nicht-invasive Monitoring nach allogener Nierentransplantation ist das chemotaktische Chemokin *interferon-inducible protein 10* (IP-10). Der Rezeptor für IP-10 ist CXCR3 (C-X-C Motiv), welcher überwiegend auf aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird. In zwei unabhängigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Induktion von IP-10 auf mRNA als auch auf Proteinebene mit einer akuten zellulären Rejektion assoziiert ist (TATAPUDI et al. 2004; HU et al. 2004). Allerdings wurden diese Untersuchungen von IP-10 zum Zeitpunkt der histologisch diagnostizierten akuten Abstoßung durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die Analyse von IP-10 prädiktive Eigenschaften für die Vorhersage einer Transplantatverschlechterung besitzt, wurde im Rahmen der eigenen Untersuchungen eine retrospektive, kinetische Analyse der IP-10 mRNA und Proteinexpression im Urin nierentransplantierte Patienten durchgeführt. Die Ergebnisse belegen, dass im Vergleich zu Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion bis zu sieben Tage vor der klinischen Indikation (erhöhte Serumkreatininspiegel) einer Biopsientnahme, eine signifikante Induktion von IP-10 im Urin von Patienten mit einer akuten zellulären Abstoßung zu detektieren ist. Dabei betrug die Spezifität und Sensitivität der IP-10 Proteinexpression für die Vorhersage einer akuten Abstoßung 71% sowie 95%. Es zeigte sich, dass insbesondere Patienten mit erhöhten IP-10 Konzentrationen im Urin während der ersten vier Wochen post Transplantation unter einer eingeschränkten Transplantatfunktion nach sechs Monaten litten. Diese Assoziation war völlig unabhängig von dem Auftreten einer akuten Abstoßung in der Frühphase post Transplantation. Zusammenfassend betrachtet implementieren unsere Daten, dass eine frühzeitige Induktion von IP-10 durch Alloantigen-unabhängige Risikofaktoren (verlängerte und kalte Ischämie, operative Manipulation) zu einer Rekrutierung IFN γ produzierender CXCR3+ Lymphozyten in das Transplantat führt. Die Sezernierung von IFN γ führt ferner zu einer verstärkten IP-10 Produktion und somit zu einer Initiierung eines *Circulus vitiosus*. Die Induktion von IP-10 mRNA und Protein im Urin ist folglich ein frühzeitiger Indikator inflammatorischer Prozesse im Allotransplantat und prädiktiv für eine subklinische Immunaktivierung, welche einen Transplantatverlust im Langzeitverlauf begünstigt.

M. Matz, J. Beyer, D. Wunsch, M.-F. Mashreghi, M. Seiler, J. Pratschke, N. Babel, H.-D. Volk, P. Reinke and **K. Kotsch**. *Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. Kidney Int. 2006 May;69(9):1683-90.*

Die polymorphen *major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related* Proteine A and B (MICA/B) werden in Folge von zellulärem Stress u. a. auf Endothelzellen induziert. Es ist mittlerweile gut dokumentiert, dass klassische HLA Antigene in transplantierten Patienten die Synthese von Alloantikörpern stimulieren und diese mit einem kurzen Transplantatüberleben sowie mit chronischer Rejektion korreliert werden können (LEE et al. 2002). Hierbei erkennen die Alloantikörper HLA Klasse I Antigene und aktivieren Effektorfunktionen. Folglich könnten auch MICA Antigene ein potentielles Ziel für Alloantikörper sein. Die Untersuchungen von ZWIRNER et al. (2000) zeigen, dass gegen MIC Antigene gerichtete Alloantikörper in den Seren von transplantierten Nieren-, Herz- und Lungenempfängern nachweisbar waren und sich diese von gegen HLA Klasse I gerichteten Antikörpern unterschieden. MIC Proteine dienen als Liganden für NKG2D, einem aktivierenden Zytotoxizitätsrezeptor, welcher mit DAP10, einem transmembranen Signalprotein, assoziiert ist und auf NK-Zellen als auch auf $\gamma\delta$ T-Zellen und $\alpha\beta$ CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird. Die Bindung zwischen MIC Antigenen und NKG2D induziert eine zytolytische Aktivität (BAUER et al. 1999). Gegenstand unserer Untersuchungen war, ob eine akute zelluläre Abstoßung zu einer Induktion von MICA auf mRNA Ebene im renalen Gewebe als Konsequenz des zellulären Stresses führt, und ob dies in einer Aktivierung des NK-Zellrezeptors NKG2D resultiert. Im Gegensatz zu bislang publizierten Daten konnten wir keine erhöhten mRNA Expressionslevel von MICA in renalen Transplantatbiopsien mit der Diagnose einer akuten zellulären oder chronischen Rejektion nachweisen. Hingegen belegen unsere Daten eine signifikante Assoziation zwischen der NKG2D mRNA Expression im Transplantat (Urin/Biopsie) und einer akuten sowie chronischen Dysfunktion. Dabei korrelierte das Expressionsniveau von NKG2D mit dem Schweregrad der akuten Abstoßung. Weiterhin ist die NKG2D mRNA Expression prädiktiv für eine eingeschränkte Transplantatfunktion nach sechs Monaten post Transplantation. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die Langzeitfunktion nach 12 und 18 Monaten gemacht werden. Im Gegensatz zu der Induktion von IP-10 (MATZ et al. 2006) war diese Assoziation nicht unabhängig von dem Auftreten einer akuten Abstoßung. Signifikant induzierte NKG2D mRNA Expressionslevel konnten auch im Urinzellsediment nierentransplantierte Patienten mit einer akuten Abstoßungskrise während der ersten drei postoperativen Monate nachgewiesen werden. Diese signifikante Geninduktion konnte bereits zwei bis drei Tage vor der bioptischen Bestätigung einer akuten Abstoßung detektiert werden. Es besteht die Annahme, dass die durch NKG2D vermittelten Effektormechanismen selektiv zu einer Aktivierung und Expansion zytotoxischer T-Lymphozyten im Transplantat führen und somit die Entzündungsreaktion während einer akuten Abstoßung begünstigen. Die signifikante mRNA Expression von NKG2D in

Biopsien zum Zeitpunkt einer chronischen Transplantatnephropathie implementiert, dass dieser Effekt im Langzeitverlauf persistiert.

M. Seiler, I. Brabcova, O. Viklicky, P. Hribova, C. Rosenberger, J. Pratschke, A. Lodererova, M. Matz, C. Schönemann, P. Reinke, H.-D. Volk, and **K. Kotsch**. *Heightened expression of the cytotoxicity receptor NKG2D correlates with acute and chronic nephropathy after kidney transplantation. American Journal of Transplantation. 2006 Dec 15; (6):1-11.*

Umfangreiche Arbeiten belegen, dass die Expression des Wachstumsfaktors *transforming growth factor 1* (TGF β 1) in renalen Biopsien mit interstitieller Fibrose, tubulärer Atrophie, sowie mit chronischer Transplantatnephropathie korreliert (BORDER & RUOSLAHTI 1992; BORDER & NOBLE 1994; VIKLICKY et al. 2003). Dabei agiert TGF β 1 als ein wichtiger Regulator für die Synthese extrazellulärer Matrix (Collagen, Fibronectin) sowie für eine verstärkte Expression von Integrinen. Obwohl TGF β 1 eher über immunsuppressive Eigenschaften verfügt, scheint es auch eine pro-inflammatorische Bedeutung in Geweben zu besitzen. Übereinstimmend mit der Beobachtung, dass TGF β 1 einen wesentlichen Einfluss auf die Wundheilung hat, besitzt es chemotaktische Eigenschaften für die Rekrutierung von Leukozyten. Ferner belegen jüngste Arbeiten den Einfluss von TGF β 1 auf die akute zelluläre Abstoßung, in dem es die Expression von α Eb7 Integrin auf CD8+ Lymphozyten kontrolliert und somit zytotoxische Effektorfunktionen begünstigt (HADLEY et al. 1999, 2001). Unsere eigenen Untersuchungen dokumentieren, dass erhöhte mRNA Expressionslevel von TGF β 1 in renalen Biopsien mit einer akuten zellulären Abstoßung sowie mit einer chronischen Transplantatnephropathie assoziiert werden können. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Induktion von TGF β 1 während einer akuten zellulären Abstoßung zu einer verstärkten Zytolyse und der damit verbundenen Gewebeerstörung führt. So scheint eine anhaltende Produktion von TGF β 1 im Langzeitverlauf eine Veränderung des renalen Gewebes zu beeinflussen; ein Charakteristikum der chronischen Transplantatnephropathie. Eine Induktion von TGF β 1 ist folglich prädiktiv für eine Funktionsverschlechterung des Transplantates bei Patienten mit akuter zellulärer Rejektion, in dem es die Entwicklung einer chronischen Transplantatnephropathie begünstigt.

P. Pribylova-Hribova, **K. Kotsch**, A. Lodererova, O. Viklicky, S. Vitko, H.-D. Volk, J. Lacha. *TGF-beta1 mRNA up-regulation influences chronic renal allograft dysfunction. Kidney Int. 2006 May;69(10):1872-9.*

3.3. Bedeutung der KIR/HLA Liganden Kompatibilität

Die akute zelluläre Abstoßung nach allogener Nierentransplantation ist das Resultat eines multifaktoriellen Prozesses sowie der Interaktion immunkompetenter Zellen, welche in das transplantierte Organ infiltrieren. Dabei bilden zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) die Haupteffektorzellen, indem sie zur Gewebeerstörung beitragen. Diese Beobachtung wird durch das Vorhandensein von zytotoxischen Effektormolekülen in Transplantatbiopsien gestützt (LIPMAN et al. 1994; VASCONCELLOS et al. 1998; PAVLAKIS et al. 1999). Mittlerweile gibt es zunehmende Evidenzen, dass auch die angeborene Immunantwort sowohl bei der Transplantatabstoßung als auch bei der Toleranzinduktion eine wesentliche Rolle spielt (SEINO et al. 2001; MCNERNEY et al. 2006). Die Infiltration von Natürlichen Killerzellen (NK) des Empfängers implementiert folglich, dass eine Aktivierung von NK-Zellen in der Frühphase für das Allotransplantat von Bedeutung sein könnte. Bislang verbleiben jedoch die funktionellen Mechanismen, welche zu einer Aktivierung von NK-Zellen bei der soliden Organtransplantation führen könnten, ungeklärt. Humane NK-Zellen (MORETTA et al. 1990), $\gamma\delta$ TCR+ T-Zellen sowie *memory/effector* $\alpha\beta$ TCR+ T-Zellen (PHILLIPS et al. 1995) exprimieren so genannte *killer-cell Ig-like* Rezeptoren (KIRs), welche aus inhibitorischen als auch aktivierenden Rezeptoren bestehen. KIR Rezeptoren erkennen HLA Klasse I Liganden auf Antigen-präsentierenden Zellen; insbesondere HLA-C Allele sowie das Bw4 Motiv (GUMPERZ et al. 1995; CARRINGTON & NORMAN 2003). Es besteht die Annahme, dass die Reaktivität der NK-Zelle durch die Balance ihrer inhibitorischen als auch aktivierenden Signale determiniert wird. Unter normalen Bedingungen wird eine Aktivierung der NK-Zelle durch das dominante Signal der inhibitorischen Rezeptoren verhindert. Folglich kann die Aktivierung einer NK-Zelle durch das Ausbleiben inhibitorischer Signale oder durch eine Verstärkung der aktivierenden Signale ausgelöst werden. Die Basis für diese Annahme bildet die *missing-self-Hypothese*, welche postuliert, dass eine ausreichende MHC Expression die Aktivierung der NK-Zelle verhindert (LJUNGGREN & KARRE 1990). Umfangreiche klinische Untersuchungen belegen die funktionelle Bedeutung von fehlenden KIR Liganden auf Empfängerzellen, insbesondere bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT). Bei einem Mismatch zwischen Spender und Empfänger HLA Allelen (HLA-C) führen die aktivierten NK-Zellen des Spenders zu einem Anti-Leukämieeffekt sowie zu einer verminderten Rate an Graft versus Host Disease (GvHD) (RUGGERI et al. 2002).

Basierend auf diesen Ergebnissen postulierten wir, dass das Risiko einer akuten oder subklinisch akuten Abstoßung in der Frühphase nach allogener Nierentransplantation

durch die allogene Interaktion zwischen Empfänger KIR Rezeptoren auf NK-Zellen und den HLA Liganden des Transplantates beeinflusst wird. Transplantate, welche nicht die MHC Klasse Liganden des Empfängers exprimieren, unterliegen vermutlich einer höheren Alloreaktivität der NK-Zellen. In einer retrospektiven klinischen Studie konnten wir zeigen, dass Transplantate, welche homozygot den HLA-C Liganden für den inhibitorischen KIR Rezeptor KIR2DL1 exprimierten (HLA-C Gruppe 2), einen besseren Verlauf post Transplantation zeigten. Ferner konnte eine signifikant geringere Anzahl inhibitorischer KIR Rezeptoren für Patienten detektiert werden, die eine akute Abstoßung innerhalb der ersten drei Monate post Transplantation erlitten. Die Analyse einzelner KIR/HLA Liganden-Interaktionen belegt die Assoziation einer signifikant höheren Anzahl an Matches für die Rezeptoren KIR2DL2/DS2 sowie einer signifikant höheren Anzahl an Mismatches für den inhibitorischen Rezeptor KIR2DL3 mit einer stabilen Transplantatfunktion. Zusammenfassend betrachten und dokumentieren unsere eigenen Daten erstmalig die Bedeutung der KIR/HLA Ligandeninkompatibilität als einen weiteren Alloantigen-abhängigen Risikofaktor für das Transplantatüberleben nach allogener Nierentransplantation, indem definierte Rezeptor-Liganden Interaktionen mit akuter zellulärer Abstoßung assoziiert werden konnten.

K. Kunert, M. Seiler, M.F. Mashreghi, K. Klippert, C. Schönemann, K. Neumann, J. Pratschke, P. Reinke, H.-D. Volk and **K. Kotsch**. *KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation. Transplantation, Dec 15;84(11):1527-33.*

4. Alloantigen-unabhängige Faktoren

Zahlreiche klinische und experimentelle Untersuchungen belegen den Einfluss Alloantigen-unabhängiger Faktoren auf die Entwicklung der chronischen Transplantatdysfunktion, wobei ein akzelerierender, bzw. synergistischer Zusammenhang mit Alloantigen-abhängigen Faktoren vermutet werden kann. Langzeituntersuchungen nach experimenteller isogener Nierentransplantation dokumentieren morphologische als auch strukturelle Veränderungen, welche chronischen Rejektionen nach allogener Organtransplantation gleichen (TULLIUS et al. 1994). Bei klinischen Untersuchungen zeigte sich, dass ca. 40% der Nierentransplantate zwischen eineiigen Zwillingen nach 10 Jahren ihre Funktion einstellten. Dies wird zum Teil auf ein Rezidiv der Grunderkrankung zurückgeführt, andererseits jedoch mit Schädigungen durch die Transplantation "per se" erklärt. Die Langzeitfunktion nach Transplantation von nichtverwandten Lebendspenderorganen ist im Vergleich zu verwandten Lebendspenderorganen identisch. Andererseits ist die Langzeitfunktion von Leichenspenderorganen immer schlechter als die Funktion von Lebendspenderorganen, trotz des üblicherweise besseren immunologischen Matchings der Leichenspenderorgane (TERASAKI et al. 1995, NICHOLSON et al. 2000). Die bessere Langzeitfunktion von immunologisch optimal gematchten Organen unterstreicht die Wichtigkeit immunologischer Parameter für die chronische Organdysfunktion, andererseits relativiert die Auswertung großer Patientenkollektive deren Bedeutung (TERASAKI et al. 1995). Eine Reihe von Spender-spezifischen Risikofaktoren definiert die Organqualität; so wird diese bereits vor Organentnahme u.a. durch Spenderkriterien (Spenderalter, spender-assoziierte Erkrankungen), den Hirntod des Spenders, Intensivtherapie und deren Dauer, chirurgische Manipulationen bei Organentnahme sowie durch die Ischämie beim Organtransport beeinflusst (PRATSCHKE et al. 1999; KOO et al. 1999; VAN DER HOEVEN et al. 2000). Die Gesamtheit dieser Risikofaktoren vor Transplantation führt zu einer unspezifischen immunologischen Aktivierung des Organs, welche nach Transplantation eine verstärkte Empfängerantwort induziert.

4.1. Diagnostik und Therapie des Ischämie-/Reperfusionsschadens

Die Gesamtischämiezeit für das transplantierte Organ ergibt sich aus der Summe der initialen warmen Ischämie, der anschließenden kalten Ischämie während der Aufbewahrung und des Transports sowie der für die Reperfusion benötigten Zeit. Dabei ist eine Vielzahl von Immunprozessen mit einem Ischämie-/Reperfusionsschaden assoziiert. Es kommt zu einer Bildung und Freisetzung freier Sauerstoffradikale (engl.

reactive oxygen species, ROS) (BONVENTRE 1993), einer Rekrutierung von aktivierten Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen (DE GREEF et al. 1998; BURNE-TANEY et al. 2003), zu einer Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine/Chemokine (ARAKI et al. 2004) und einer Komplementaktivierung (BONVENTRE & ZUK 2004) sowie zu einer Aktivierung der Leukozytenadhäsion. Die Entzündung resultiert ferner in eine Aktivierung des Endothels mit verstärkter Adhäsion (z.B. durch eine Induktion von E- und P-Selectin oder *intracellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) sowie einer Migration Antigen-präsentierender Zellen in die sekundären lymphatischen Organe zur Initiierung einer Allo-Immunantwort. Zu den wichtigsten induzierten pro-inflammatorischen Zytokinen/Chemokinen zählen neben Interleukin-1beta (IL-1b), IL-8 sowie das *monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1). Pro-thrombotische Moleküle (z.B. *Tissue Factor*, TF) konnten ebenfalls mit einer ischämischen Schädigung assoziiert werden (CINES et al. 1998). Mittlerweile wurde gezeigt, dass die angeborene Immunantwort ebenfalls in die Pathogenese des Ischämie-/Reperfusionsschadens involviert ist. Hintergrund ist die Beobachtung, dass eine Reihe von Toll-like Rezeptoren (TLR) für die Initiierung eines Ischämie-/Reperfusionsschadens mit verantwortlich ist (ZHAI et al. 2004).

Aktuell wird eine organprotektive Therapie im Organspender durch die Gabe von konservierender Perfusionslösung begonnen. Weitergehende therapeutische Ansätze im Vorfeld der Transplantation, im Sinne einer sogenannten Spendertherapie, sind bislang klinisch nicht etabliert. Als Konzept bietet sich eine Reduktion der durch Alloantigen-unabhängige Faktoren bedingten unspezifischen Schädigungen im Organspender an. Von Bedeutung scheint in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen der Organqualität vor Transplantation und der Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen nach Transplantation zu sein. Vor diesem Hintergrund erscheint die anti-inflammatorische Vorbehandlung des Organspenders als eine sinnvolle therapeutischer Alternative. Ein Ansatz zur Untersuchung und Prävention des Transplantatschadens vor und nach Transplantation ist die Induktion protektiver Gene (HANCOCK et al. 1998). So konnte durch die erhöhte Expression des Hitzeschockproteins Hämoxxygenase 1 (HO-1) in zahlreichen experimentellen Ansätzen eine verbesserte Transplantatfunktion sowohl im Kurz- als auch im Langzeitverlauf nachgewiesen werden (SOARES et al. 1998; AMERSI et al. 1999; TULLIUS et al. 2002; KATORI et al. 2002, SHEN et al. 2005). Die Induktion von HO-1 unter Verwendung des chemischen Induktors Kobaltprotoporphyrin (CoPP) oder mittels Gentransfer von HO-1 im Spenderorgan, schützt nach einer Lebertransplantation in Ratten vor Ischämie/Reperfusion-bedingten Schäden und verlängert das Überleben nach Transplantation. Dies beruht vermutlich auf einer Suppression der Th1 Zytokinproduktion sowie einer verminderten Apoptose nach

Reperfusion (AMERSI et al. 1999; KATORI et al. 2001). Die Enzymfamilie der Hämoxygenasen katalysiert die erste und limitierende Reaktion des Hämabbauweges und reguliert damit die Konzentration von Häm. Bei dieser Reaktion wird der Porphyrinring des Häms auf oxidative Weise gespalten. Es entstehen equimolare Mengen an Kohlenstoffmonoxid (CO), Biliverdin-Ix (BV) und ein divalentes ungebundenes Eisenion (Fe²⁺) (TENHUNEN et al. 1970).

Kurz nach einer soliden Organtransplantation sind spender-spezifische Antigen-präsentierende Zellen (APCs) die Hauptinitiatoren einer Allostimulation, indem sie in die sekundären lymphatischen Organe des Spenders migrieren und dort T-Zellantworten gegen das Allotransplantat initiieren (LARSEN et al. 1990; SAIKI et al. 2001). Dabei wird die Reifung Spender-spezifischer APCs *in vivo* durch inflammatorische Prozesse, wie z.B. einen Ischämie-/Reperfusionsschaden, begünstigt. Eine Inhibition der Antigenpräsentation Spender-spezifischer APCs bietet folglich einen interessanten Ansatz, die Alloimmunantwort zu inhibieren, frühe Abstoßungsreaktionen zu verhindern und somit die Langzeitfunktion des Transplantates zu verlängern. So führt die Depletion dieser APCs im Allotransplantat und dem damit verbundenen Ausschluss der direkten Antigenpräsentation zu einer verzögerten Abstoßungsreaktion (BENICHO 1999). Neben Bilirubin wird in der derzeitigen Diskussion insbesondere dem niedermolekularen Abbauprodukt CO der größte Anteil an den zellprotektiven Eigenschaften des HO-1 Systems zugesprochen (MORITA et al. 1995; OTTERBEIN et al. 2000; SONG et al. 2004). Nicht nur die Induktion von HO-1, sondern auch die Administration von CO konnte in verschiedenen Transplantationsmodellen einen Schutz gegenüber Ischämie-/Reperfusionsschaden verbunden mit einer verbesserten Langzeitfunktion des Allotransplantats bewirken (KAIZU et al. 2005; MISHRA et al. 2006; KOHMOTO et al. 2007). Hierbei deutete vieles auf eine Hemmung der DC Aktivierung hin. Unsere eigenen Arbeiten im experimentellen Tiermodell belegen die Effektivität der Behandlungsstrategie mit CO in der Qualitätsverbesserung von marginalen Organen. Interessanterweise bewirkt die Vorbehandlung von Nierenspendern mit Methylenchlorid (MC), einer Substanz die *in vivo* CO freisetzt, kurz nach der Transplantation eine Reduktion der Anzahl Spender-spezifischer APCs in der Milz und im peripheren Blut der Empfänger, verbunden mit einer verminderten Anzahl von alloreaktiven CD4⁺ T-Lymphozyten im Transplantat. Zusätzlich führt die verringerte Immunogenität des Allotransplantats nach MC Vorbehandlung der Spendertiere zu einer Hemmung der chronischen Transplantatdysfunktion, charakterisiert durch eine signifikante Reduktion der Arteriosklerose, Fibrose und tubulären Atrophie.

P.N.A. Martins, A. Reutzel-Selke, A. Jurisch, C. Denecke, K. Attrot, A. Pascher, **K. Kotsch**, J. Pratschke, P. Neuhaus, H.-D. Volk and S.G. Tullius. *Induction of carbon monoxide in donor animals prior to organ procurement reduces graft immunogenicity and inhibits chronic allograft dysfunction. Transplantation. 2006 Oct 15;82(7):938-944.*

Die Verwendung marginaler Spenderorgane ist risikobehaftet und resultiert häufig in einer eingeschränkten Langzeitfunktion. Ferner existieren derzeit keine definierten Parameter zur Einschätzung des individuellen Risikos marginaler Transplantate sowie für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien. Im Rahmen unserer eigenen Arbeiten wurde mittels cDNA-Microarraytechnologie ein Set von differentiell exprimierten Genen in Abhängigkeit des Ischämieschadens in einem experimentellen Nierentransplantationsmodell der Ratte analysiert. Unter Berücksichtigung des Einflusses der Stärke des Ischämieschadens haben wir ein Set von interessanten Kandidatengenen identifiziert, unter denen sich die beiden Chemokine IP-10 (CXCL10), *C-C motif ligand 19* (CCL19), das Adhäsionsmolekül *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) sowie die drei Immunoproteasomenuntereinheiten PSMB8, PSMB9 und PSMB10 befanden. Letztere sind Teil des 20S Immunoproteasoms, welches in Folge einer IFN γ Induktion entsteht. Das Proteasom ist ein multikatalytischer Proteasekomplex, der neben der MHC Klasse I vermittelten Antigenpräsentation eine funktionelle Rolle bei der gesamten Proteindegradation in der Zelle spielt (GRIFFIN et al. 1998). In jüngerer Zeit wird der Inhibition des Proteasomenkomplexes aufgrund der protektiven Effekte nach Ischämie/Reperfusion großes Interesse entgegengebracht. So konnten die Ischämie-/Reperfusionsschäden im Herzinfarktmodell des Schweins durch die Anwendung von spezifischen Inhibitoren der Proteasomen vermindert werden (PYE et al. 2003). Ein anti-inflammatorischer Effekt von Proteasomeninhibitoren auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden wird derzeit von uns in einem experimentellen Nierentransplantationsmodell der Ratte überprüft.

Eine große Anzahl von Publikationen beschreibt die schützende Wirkung von HO-1 gegenüber Ischämie/Reperfusionsschäden in Herz-, (KATORI et al. 2002), Nieren-, (TULLIUS et al. 2002) und Leber- (AMERSI et al. 1999) Transplantationsmodellen. Allerdings sind die molekularen Mechanismen der protektiven Wirkung des Enzyms oder dessen Abbauprodukte (insbesondere CO) weitgehend unbekannt. Chauveau et al. (2005) konnten erstmals einen direkten Effekt der CoPP induzierten HO-1 Expression und einer Inhibition der LPS vermittelten Reifung Dendritischer Zellen (DC) demonstrieren. Die Ergebnisse inkludieren, dass eine CoPP Vorbehandlung von Organspendern die Ischämie/Reperfusion vermittelte Reifung donor-spezifischer DCs inhibiert, die Inzidenz T-zellvermittelter akuter Rejektionsepisoden kurz nach Transplantation verringert und somit das Überleben des Allotransplantats verlängert. Unsere eigenen Untersuchungen belegen diese Beobachtungen. Obwohl eine Spendervorbehandlung mit CoPP oder MC zu keiner Modulation der mittels cDNA Microarray identifizierten Kandidatenmarker (PSMB8-10, IP-10, CCL19) in Folge eines Ischämie-/Reperfusionsschadens im

Allotransplantat führt, konnte hingegen eine signifikante Inhibition dieser Gene sowie der MHC Klasse II Expression in der Milz von Nierentransplantatempfängern detektiert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Annahme, dass eine Migration reifer DCs in die sekundären lymphatischen Organe nach HO-1 Induktion inhibiert ist. Eine Inhibition der Reifung Dendritischer Zellen wurde im Anschluss unter Verwendung von in vitro Experimenten verifiziert. Die Induktion von Immunoproteasomen scheint folglich – neben einer erhöhten MHC Klasse II Expression und weiterer kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD86) – ein Charakteristikum für die „Immunigenität“ des Allografts in Folge eines Ischämie-/Reperfusionsschadens zu sein. Wir schlussfolgern daher, dass eine Induktion von HO-1 zu einer reduzierten Alloreaktivität nach Ischämie-/Reperfusionsschäden führt, in dem (i) eine Inhibition der Reifung und Migration dendritischer Zellen in die sekundären lymphatischen Organe erreicht wird, (ii) weniger allogene Peptide durch die Reduktion von Immunoproteasomen synthetisiert werden und folglich eine schwächere CD8 T-Zellantwort induziert wird sowie (iii) eine Hemmung von chemotaktischen Chemokinen erzielt wird, welche für das Homing von Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe verantwortlich sind. Folglich bietet die Spendervorbehandlung mit HO-1 einen interessanten Ansatz für die Verbesserung des Langzeitüberlebens marginaler Spenderorgane.

K. Kotsch, P.N.A. Martins, R. Klemz, U. Janssen, B. Gerstmayer, A. Dernier, A. Reutzelselke, U. Kuckelkorn, S.G. Tullius, and H.-D. Volk. *Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration. Antioxidants & Redox Signaling, 2007, Dec;9(12):2049-64.*

4.2. Einfluss des Spender-Hirntodes auf Ischämie-/Reperfusionsschaden und akute Abstoßungsreaktionen

Transplantate von nichtverwandten Lebend Spendern zeigen unabhängig von der immunologischen Kompatibilität eine signifikant bessere Kurz- und Langzeitfunktion im Vergleich zu Transplantaten von hirntoten Organspendern (KOO et al. 1999, FARMER et al. 2001). Die Beobachtung, dass das Überleben von Nierentransplantaten von nichtverwandten Lebend Spendern annähernd identisch mit dem Organüberleben von verwandten Lebend Spendern ist, demonstriert die Bedeutung Antigen-unabhängiger Faktoren und relativiert die Rolle von HLA-Disparitäten (TERASAKI et al. 1995). Die Vermutung, dass das unterschiedliche Organüberleben nach Transplantation von Kadaver- und Lebendspenderorganen auf pathophysiologischen und weniger auf genetischen Unterschieden beruht, führte zu Untersuchungen des Zusammenhangs funktioneller und struktureller Veränderungen assoziiert mit unspezifischer Organschädigung.

Bereits in den 80er Jahren wurden die ersten Untersuchungen zum Hirntod des Organspenders durchgeführt und eine signifikant reduzierte Sofortfunktion von Organen hirntoter Spender im Vergleich zu denen von Lebend Spendern beobachtet (WICOMB et al. 1986; NOVITZKY et al. 1988; NOVITZKY 1997). So konnten an Herzen hirntoter Organspender morphologische als auch funktionelle Veränderungen in experimentellen Modellen beschrieben werden. Im Myokard zeigten sich neben einer ödematösen Auflockerung der myozytären Strukturen Infiltrate mit Monozyten (NOVITZKY et al. 1987). In Nieren und Lungen derselben Spender fanden sich ebenfalls strukturelle Veränderungen, welche auf hormonelle und metabolische Entgleisungen zurückgeführt wurden. Veränderungen des Kortisolspiegels und reduzierte Schilddrüsenhormone in Kombination mit einer Azidose wurden in diesem Zusammenhang als ursächlich diskutiert (POWER & VAN HEERDEN 1995). Die Veränderungen im Rahmen des Hirntodes des Spenders wurden unter dem Begriff „autonomer Sturm“ zusammengefasst und beinhalten massive Blutdruckschwankungen, Hypotension, Koagulopathien sowie Elektrolyt- und Hormonentgleisungen (GRAMM et al. 1992; MERTES 1996). Der hypertensiven Stressreaktion nach Induktion des Hirntodes folgen normotensive und im weiteren Verlauf hypotensive Phasen mit kardiopulmonaler Instabilität. Der gesamte Organismus ist einer massiven sympathogenen Stimulation, vermittelt durch systemisch oder endogen freigesetzte Katecholamine, ausgesetzt (MERTES 1996; HERIJGERS 1996). Nach der initial hypertensiven Phase während des „autonomen Sturms“ folgen meist hypotensive Phasen mit zunehmender Bradykardie und Arrhythmien. Der Verlust der

Gefäßautoregulation führt zur Hypotension mit reduzierter Blut- und Sauerstoffversorgung des Gewebes.

Allogene Transplantate, sowohl von marginalen Spendern als auch von hirntoten Organspendern, sind zum Zeitpunkt der Entnahme immunologisch aktiviert. Somit initiieren oder amplifizieren sie zum Zeitpunkt der Transplantation die Immunantwort des Organempfängers (KOO et al. 1999; PRATSCHKE et al. 1999; WILHELM et al. 2000). Das potenziell aktivierte Organ provoziert eine Interaktion zwischen unspezifischen proinflammatorischen Schäden und der zum Zeitpunkt der Reperfusion einsetzenden Immunantwort. Die Hypothese, dass der Faktor Hirntod die Immunogenität prospektiver Transplantate erhöht, wurde erstmals von TILNEY und seinen Mitarbeitern überprüft (TAKADA et al. 1998). Sie dokumentierten erstmals in einem Modell der explosiven Hirntodinduktion eine massive Steigerung der Transkriptionsraten proinflammatorischer Zytokine in peripheren Organen. Es zeigte sich experimentell, dass bereits im Organspender die Transkription proinflammatorischer Zytokine erhöht ist und somit ein immunologisch aktiviertes Organ transplantiert wird. Klinische Studien belegen in Nierenbiopsien hirntoter Spender bereits vor Transplantation eine erhöhte Expression von Selektinen in Verbindung mit neutrophilen Zellinfiltraten (KOO et al. 1999). Eigene klinische Daten in sequentiell durchgeführten Leberbiopsien (nach Laparotomie des Spenders, vor Reperfusion im Spender, vor Reperfusion im Empfänger, eine Stunde nach Reperfusion im Empfänger) demonstrieren signifikant erhöhte Transkriptionsraten proinflammatorischer Zytokine in Organen hirntoter Spender im Vergleich zu entsprechenden Transplantaten von Lebendspendern.

Die Bestimmung von Zytokinen in definierten zeitlichen Abständen nach Reperfusion ist ein guter Marker für das Ausmaß des Reperfusionsschadens. Der Hirntod des Spenders triggert die Expression der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und IL-6. Die Induktion von IL-10 zeigte in den kinetischen Untersuchungen signifikante Unterschiede zwischen Hirntod- und Lebendspende insbesondere nach Laparotomie und vor Organentnahme sowie im sequentiellen Verlauf. Das Chemokin *macrophage inflammatory protein 1 alpha* (MIP-1 alpha) sowie $\text{TGF}\beta$ zeigen zu allen Untersuchungszeitpunkten eine signifikante Induktion in hirntoten Spendern. Die Zytokine IL-4 und $\text{INF}\gamma$ sind zwar zu allen Zeitpunkten erhöht, allerdings war nur die Expression unmittelbar nach Laparotomie zwischen beiden Untersuchungsgruppen signifikant. Die signifikante Induktion der Antigene CD3 und CD25 in Leichenspendern kann dabei als ein direkter Hinweis auf lymphozytäre Infiltrate diskutiert werden. Eine erhöhte Immunogenität des Transplantates in hirntoten Organspendern konnte anhand einer verstärkten Expression der MHC

Klasse II Expression detektiert werden. Die Serumkonzentration von IL-6 und IL-10 waren im Gegensatz zu $\text{TNF}\alpha$ ebenfalls signifikant in Leichenspendern erhöht. Um zu überprüfen, ob die Immunaktivierung in Folge des Hirntodes einen direkten Einfluss auf das Transplantatüberleben hat, wurden im Rahmen dieser Untersuchung die klinischen Serumparameter ALT (Alanin-Aminotransferase) und AST (Aspartat-Aminotransferase) analysiert. Es zeigte sich, dass ein signifikanter Anstieg beider Parameter in den Seren von Patienten, welche ein Organ von hirntoten Spendern erhielten, am ersten und dritten postoperativen Tag zu verzeichnen war. Ferner konnte eine erhöhte Rate an akuten Abstoßungen sowie primären Nichtfunktionen für die Transplantate hirntoter Spender detektiert werden. Zusammenfassend betrachtet unterstreichen unsere Daten die Bedeutung des Hirntodes nach allogener Lebertransplantation. Dabei handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, welches einen Ischämie/Reperfusionsschaden sowie die Entwicklung akuter Abstoßungen begünstigt, und in einer eingeschränkten Initialfunktion resultiert. Inwiefern die Induktion der Inflammation in hirntoten Spender die Langzeitfunktion des Allotransplantates beeinflusst, muss in weiterführenden klinischen Untersuchungen untersucht werden.

K. Kotsch*, S. Weiss*, M. Francuski, A. Reutzel-Selke, L. Mantouvalou, R. Klemz, O. Kuecuk, S. Jonas, C. Wesslau, F. Ulrich, A. Pascher, H.-D. Volk, S.G. Tullius, P. Neuhaus, J. Pratschke. *Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. American Journal of Transplantation. 2007 Jun;7(6):1584-93. *Beide Autoren sind gleichberechtigte Erstautoren*

4.3. Therapeutische Ansätze zur Verbesserung der Transplantatqualität nach Spender-Hirntod

Die immunologischen Auswirkungen des Spenderhirntodes entsprechen pathophysiologisch denen nach Ischämie-/Reperfusionsschäden. Vergleicht man weitergehend die Langzeitfunktion transplanteder Organe, so ähneln die morphologischen und immunologischen Veränderungen nach dem Hirntodschaden denen nach ausgeprägter ischämischer Schädigung. Als gemeinsamer pathophysiologischer Mechanismus steigert der unspezifische Organschaden die Immunogenität des Organs. Nach Transplantation kommt es zu einer verstärkten Empfängerimmunantwort, welche sowohl die Inzidenz als auch die Intensität akuter und chronischer Abstoßungen beeinflusst. Die Beobachtung, dass Risikofaktoren für die Transplantatfunktion sowohl Antigen-abhängig als auch Antigen-unabhängig sind, betont die Bedeutung der Transplantatqualität. Möglicherweise lässt sich sowohl durch eine Reduktion Hirntod-assoziiierter Schäden eine Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens mit einer resultierenden verbesserten Langzeitfunktion erzielen. In diesem Zusammenhang bietet sich als mögliches Therapiekonzept die Vorbehandlung hirntoter Organspender an.

Bisherige Ansätze unter Verwendung von Hormonersatztherapien oder Katecholaminen in hirntoten Spendern sind widersprüchlich und nicht viel versprechend (NOVITZKY & COOPER 1988, HARMS et al. 1993, SCHNUELLE et al. 1999). Weitere Arbeiten untersuchten die Effekte einer gezielten Spendervorbehandlung mit löslichen *P-selectin glycoprotein ligand* (sPSGL) nach allogener Nierentransplantation (GASSER et al. 2002), welche in einer verminderten Rate akuter Abstoßungen sowie verbesserten Langzeitfunktionen resultierte. Die anti-inflammatorische Potenz von Steroiden ist im klinischen Alltag bekannt und beruht neben der Proliferationshemmung immunkompetenter Zellen auf einer unspezifischen Blockade der Produktion von Zytokinen und Zellprodukten. Bisherige Untersuchungen mit Steroiden belegen eine Reduktion der zellulären und inflammatorischen Veränderungen. Nach Spendervorbehandlung waren die Funktion und das Überleben von Kadaverspenderorganen im Vergleich zu unbehandelten Organen deutlich verbessert (PRATSCHKE et al. 2001). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Hirntod-induzierten proinflammatorischen Veränderungen in Organen von hirntoten Spendern durch gezielte immunmodulatorische Spendervorbehandlung reduziert werden können und implementieren eine gezielte klinische Vorbehandlung hirntoter Spender. Jüngste Untersuchungsergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe belegen die Effizienz dieser Behandlungsstrategie für die Lebertransplantation. Die Vorbehandlung hirntoter Spender

mit Steroiden resultierte in einer signifikant niedrigen Expression von löslichen Zytokinen (z.B. IL-6, TNF α) und Chemokinen (MCP-1 and IP-10) im Serum der Patienten. Ferner konnte eine signifikante mRNA Herunterregulation von proinflammatorischen Kandidatengenen wie ICAM-1, TNF- α , MHC Klasse II, FasL, IP-10 and CD68 in den Leberbiopaten beobachtet werden. Die Bedeutung dieser Ergebnisse werden in den verbesserten Funktionsparametern (ALT, AST) sowie in einer verminderten Rate an akuten Abstoßungsreaktionen post Transplantation reflektiert.

K. Kotsch*, F. Ulrich*, A. Reutzel-Selke, A. Pascher, W. Faber, P. Warnick, S. Hoffman, M. Francuski, O. Kuecuk, G. Schumacher, C. Wesslau, A. Lun, S. Kohler, S. Weiss, S. G. Tullius, P. Neuhaus, J. Pratschke. Donor Treatment with Steroids Reduces Inflammation and Improves Graft Function and Outcome Following Deceased Liver Transplantation, *Annals of Surgery, in Druck*. *Beide Autoren sind gleichberechtigte Erstautoren

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung und Prävention des Transplantatschadens vor und nach Transplantation ist die Induktion protektiver Gene. Durch die erhöhte Expression von HO-1 konnte in zahlreichen Versuchen eine verbesserte Transplantatfunktion sowohl im Kurz- als auch im Langzeitverlauf nachgewiesen werden. Dabei konnte unsere Arbeitsgruppe die Effektivität der Behandlungsstrategie sowohl in der Prävention des Ischämie-/Reperfusionsschadens als auch in der Qualitätsverbesserung von Organen marginaler Spender nachweisen (TULLIUS et al. 2002, MARTINS et al. 2007; KOTSCH et al. 2007). So zeigt die Vorbehandlung hirntoter Spender durch Induktion von HO-1 eine deutlich verbesserte Organqualität, ein signifikant verbessertes Transplantatüberleben bei reduzierten zellulären Infiltraten (Makrophagen, CD4+ T-Lymphozyten und MHC Klasse II positive Lymphozyten) sowie eine verminderte Alloreaktivität.

K. Kotsch, M. Kordic, A. Pascher, R. Klemz, S.G. Tullius, R. Buelow, H.-D. Volk, P. Neuhaus and J. Pratschke. *Improved organ survival after HO-1 induction in brain-dead organ donors. American Journal of Transplantation. 2006 Mar;6(3):477-86.*

5. Diskussion

Sowohl Antigen-abhängige als auch Antigen-unabhängige Risikofaktoren führen initial über endotheliale Schädigungen zu einer immunologischen Transplantataktivierung. Dabei besteht ein enger Zusammenhang zwischen initial unspezifischen Antigen-unabhängigen Zellschäden und einer nachfolgenden spezifischen Antigen-getriggerten Immunantwort. Je schlechter das immunologische Matching zwischen Transplantat und Empfänger ist, umso desto stärker ist die inflammatorische Antwort auf den initial unspezifischen Schaden. Dabei kann den verschiedenen Risikofaktoren sowohl ein isolierter Einfluss als auch ein additiver oder synergistischer Effekt zugesprochen werden. Vor allem Risikofaktoren, welche bereits vor Transplantation die Organqualität definieren, scheinen nach Transplantation bei der Induktion akuter Abstoßungsreaktionen eine bedeutende Rolle zu spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, molekulare Determinanten der Transplantatqualität näher zu charakterisieren. Neben dem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen einzelner Risikofaktoren, sollten jene Kandidatenmarker die Grundlage für rechtzeitige therapeutische Optionen bilden, um eine Verlängerung des Transplantatüberlebens zu erreichen.

Da wiederkehrende Rejektionsepisoden nach der Nierentransplantation bislang zu den Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen Transplantatnephropathie gehören, könnte eine rechtzeitige Intervention in einer verbesserten Langzeitfunktion des Alлотransplantats resultieren. Ein Ziel der Transplantationsmedizin ist daher die Entwicklung alternativer Strategien, welche eine robuste und zuverlässige Diagnostik des Immunstatus transplantierten Patienten erlauben, bevor es zu einem Auftreten massiver Gewebeschädigung des Transplantates in Folge einer akuten Rejektion kommt. Viele der bislang publizierten Arbeiten, welche in renalen Biopsaten, peripherem Blut oder in Urin durchgeführt worden sind, dokumentieren das Genexpressionsprofil ausgewählter Kandidatenmarker ausschließlich zum Zeitpunkt der akuten Abstoßung. Jedoch ist eine frühzeitige Diagnose mit dem Ziel der Vorhersage einer Funktionsverschlechterung des Transplantates vor einer irreversiblen Gewebeschädigung von essentieller Bedeutung, und kann nur durch ein konsequentes Monitoring der Patienten erreicht werden. Eine Vorhersage würde eine rechtzeitige therapeutische Intervention implementieren, mit der eine Revertierung der Abstoßung erreicht werden könnte; ein Vorteil, der besonders für ambulante Patienten von großem Nutzen wäre, welche keiner engmaschigen Kontrolle unterliegen. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte insbesondere die mRNA Induktion des zytotoxischen Markers Granulysin, des Chemokins IP-10 sowie des Zytotoxizitätsrezeptors NKG2D im Urinzellsediment nierentransplantierten Patienten zum

Zeitpunkt einer akuten Abstoßung dokumentiert werden. Ferner zeigten alle Marker ein prädiktives Potential für die Vorhersage einer Funktionsverschlechterung im Vorfeld der klinischen Diagnose. Im Gegensatz zu Granulysin und IP-10 konnte eine erhöhte Expression von NKG2D sowie des Zytokins TGF β 1 nicht nur zum Zeitpunkt einer akuten zellulären Abstoßung detektiert werden, sondern auch in renalen Biopaten mit der Diagnose einer chronischen Transplantatnephropathie. Dabei waren induzierte Transkriptionsraten von NKG2D und TGF β 1 zum Zeitpunkt der Abstoßung prädiktiv für eine Funktionsverschlechterung des Transplantates im Langzeitverlauf. Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen gewonnenen Informationen bilden die Basis für ein besseres Verständnis der pathologischen Mechanismen der Transplantatabstoßung auf molekularer Ebene. Ferner könnte die Verwendung dieser und weiterer immunologischer Parameter zukünftig die Voraussetzung für die Entwicklung alternativer Diagnostika bilden. Vorrangiges Ziel dieser diagnostischen Strategien sollte die Identifikation von Patienten mit einem erhöhten Rejektionsrisiko sein, um eine Adaption der mit Nebenwirkungen assoziierten immunsuppressiven Therapie sowie eine Verbesserung des Langzeitüberlebens des Alлотransplantates zu erzielen. Neben der HLA-Disparität konnten wir erstmalig den Zusammenhang zwischen den polymorphen KIR Rezeptoren auf NK-Zellen des Empfängers und ihren korrespondierenden HLA Liganden auf dem Transplantat als einen weiteren Alloantigen-abhängigen Risikofaktor für das Transplantatüberleben dokumentieren. Es zeigte sich, dass die Homozygotie des HLA-C Liganden Gruppe 2, eine höhere Anzahl inhibitorischer KIR Rezeptoren sowie definierte Rezeptor/Liganden Matche das Risiko einer akuten zellulären Abstoßung vermindern. Diese Erkenntnisse implementieren eine funktionelle Bedeutung von NK-Zellen innerhalb der soliden Organtransplantation und müssen in weiteren Studien verifiziert werden.

Transplantate von nichtverwandten Lebendspendern zeigen unabhängig von der immunologischen Kompatibilität eine signifikant bessere Kurzzeit- und Langzeitfunktion im Vergleich zu Transplantaten hirntoter Organspender. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutsamkeit Antigen-unabhängiger Faktoren und relativiert die Rolle Antigen-abhängiger Faktoren. Unsere Untersuchungen zeigten, dass Transplantate sowohl von marginalen Spendern als auch von hirntoten Organspendern zum Zeitpunkt der Entnahme immunologisch aktiviert sind. Somit initiieren oder amplifizieren sie zum Zeitpunkt der Transplantation die Immunantwort des Organempfängers. Das potenziell aktivierte Organ provoziert eine Interaktion zwischen unspezifischen proinflammatorischen Schäden und der zum Zeitpunkt der Reperfusion einsetzenden Immunantwort. Die Trigger dieser Interaktion können Spender-assoziierte Risikofaktoren,

wie z.B. Alter, Hypertension, Diabetes mellitus, ein Ischämie-/Reperfusionsschaden oder die systemischen Effekte des Spender-Hirntodes darstellen.

Der Einfluss des Ischämie-/Reperfusionsschadens auf die Transplantatfunktion wurde in zahlreichen klinischen und experimentellen Arbeiten umfangreich beschrieben. Pathophysiologisch wird hierbei die Aktivierung einer Kaskade von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen/Chemokinen und Wachstumsfaktoren angenommen. Experimentelle Studien belegen, dass es in Folge des Ischämie-/Reperfusionsschadens zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen sowie proinflammatorischen Zytokinen mit der Folge einer Infiltration von Granulozyten, Monozyten/Makrophagen sowie von T-Lymphozyten kommt. In dem Zusammenhang konnten wir neue Kandidatenmarker für eine ischämische Schädigung unter Verwendung von cDNA Microarrays identifizieren. Die begrenzte Lebensdauer von Spenderorganen sowie das Auftreten ischämiebedingter Transplantatschäden erfordern allerdings die Entwicklung protektiver Lösungen für die Organkonservierung. Unsere Arbeiten belegen die protektiven Effekte einer Spendervorbehandlung mittels der Induktion des zytoprotektiven Enzyms HO-1 sowie dessen Abbauprodukt CO. Neben einem verbesserten Langzeitüberleben scheint ein Schutz hinsichtlich einer ischämischen Schädigung hier über eine Hemmung der DC-Aktivierung erreicht zu werden.

Der Hirntod stellt einen Antigen-unabhängigen Leichenspender-spezifischen Risikofaktor dar, der bislang unzureichend berücksichtigt wurde. In nahezu allen experimentellen Studien zu transplantationsrelevanten Fragestellungen dienen junge, gesunde Lebendspendertiere als Organspender, im Gegensatz zur klinischen Situation, in der überwiegend Organe hirntoter Organspender zur Transplantation zur Verfügung stehen. Der hirntote Organspender erleidet typischerweise eine plötzliche, irreversible und ausgeprägte Schädigung des zentralnervösen Systems. In Tiermodellen wurde demonstriert, dass die Funktion und Struktur peripherer Organe durch den Faktor Hirntod signifikant beeinflusst wird und von der Genese des Hirntodes abhängt. In unseren experimentellen Arbeiten wurden die Mechanismen der Schädigung und die Auswirkungen des Hirntodes auf die Transplantatqualität sowie auf das Ergebnis nach Transplantation untersucht. Diese Studien trugen wesentlich zum Verständnis des Risikofaktors Hirntod für den postoperativen Transplantationsverlauf bei. Wir zeigten erstmalig in klinischen Untersuchungen, dass der Hirntod des Spenders den Ischämie-/Reperfusionsschaden sowie die Häufigkeit und Intensität sowohl der akuten Abstoßungsreaktion nach allogener Lebertransplantation signifikant beeinflusst. Pathophysiologisch konnte ein Prozess postuliert werden, bei dem der unspezifischen

Aktivierung durch den Spender-Hirntod eine verstärkte immunologische Empfängerantwort nach Transplantation folgt. Dieser Mechanismus zeigt die enge Interaktion zwischen Antigen-unabhängigen und -abhängigen Faktoren in der Destruktion des Transplantates. Durch Vorbehandlungsstrategien kann die Organqualität signifikant verbessert werden. So wurde weiterführend in einem Konzept der Vorbehandlung des hirntoten Spenders ein Ansatz im experimentellen Tiermodell untersucht. Hierbei zeigten sich ebenfalls vielversprechende Ergebnisse mittels der Induktion von HO-1 hinsichtlich einer verbesserten Organqualität, eines verbesserten Transplantatüberlebens sowie einer verminderten Alloreaktivität. Die Effizienz einer Spendertherapie mit Steroiden wurde in einer klinischen Studie nach Lebertransplantation überprüft und zeigte eine signifikante Reduktion inflammatorischer Mediatoren (IL-6, TNF α), verbesserter Funktionsparameter und einer geringeren Rate an akuten Abstoßungsreaktionen nach Vorbehandlung des hirntoten Spenders.

Zusammengefasst trugen unsere Untersuchungen wesentlich zu einem besseren Verständnis der Einflussfaktoren auf die Transplantatqualität bei. Unsere Befunde dokumentieren das prädiktive Potenzial definierter Kandidatenmarker zur Vorhersage einer akuten Abstoßungsreaktion und erklären teilweise die klinische Beobachtung, dass Transplantate von Lebendspendern trotz eines ausgeprägteren MHC-Mismatches einen besseren Kurz- und Langzeitverlauf zeigen. Weitere Alloantigen-abhängige Risikofaktoren konnten in dem Zusammenhang definiert werden. Die Charakterisierung der durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden und den Spenderhirntod verursachten Veränderungen ermöglichen in Zukunft eine gezielte therapeutischen Intervention zur Verbesserung der Transplantatqualität und somit des Transplantationsergebnisses.

6. Referenzen

- ADAMS DH, HUBSCHER SG, SHAW J, ROTHLEIN R, NEUBERGER JM. Intercellular adhesion molecule 1 on liver allografts during rejection. *Lancet*. 1989; 2: 1122-5
- ALMOND PS, MATAS A, GILLINGHAM K, DUNN DL, PAYNE WD, GORES P, GRUENESSNER R, NAJARIAN JS. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation*. 1993; 55: 752-6
- AMERSI F, BUELOW R, KATO H, KE B, COITO AJ, SHEN XD, ZHAO D, ZAKY J, MELINEK J, LASSMANN CR, KOLLS JK, ALAM J, RITTER T, VOLK HD, FARNER DG, GHOBRIAL RM, BUSUTILL RW, KUPIEC-WEGLINSKI JW. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 1999; 104: 1631-9
- ANDERSON DC, BILLINGHAM RE, LAMPIN GH, MEDAWAR PB. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity*. 1951; 5: 379
- ARAKI M, SCHENK AD, FAIRCHILD RL. Cytokines and chemokines: roles in the pathophysiology and therapy of ischemia and reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2004; 9: 139-144
- AUSTYN JM, LARSEN CP. Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Semin Immunol*. 1992; 4: 227-36
- BARNARD CN. What we have learned about heart transplants. *Cardiovasc Surg*. 1968; 56: 457-68
- BASADONNA GP, MATAS AJ, GILLINGHAM KJ, PAYNE WD, DUNN DL, SUTHERLAND DE, GORES PF, GRUENESSNER RW, NAJARIAN JS. Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation*. 1993; 55: 993-5
- BAUER S, GROH V, WU J, STEINLE A, PHILLIPS JH, LANIER LL, SPIES T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999; 285: 727-9
- BENICHOU G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci*. 1999; 4: 476-80
- BONVENTRE JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 1993; 43: 1160-78
- BONVENTRE V, ZUK A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int*. 2004; 66: 480-485
- BORDER WA, RUOSLAHTI E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest*. 1992; 90: 1-7

-
- BORDER WA, NOBLE NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1286–1292
- BURNE-TANEY MJ, KOFLER J, YOKOTA N, WEISFELDT M, TRAYSTMAN RJ, RABB H. Acute renal failure after whole body ischemia is characterized by inflammation and T cell-mediated injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 285: 87-94
- CARRINGTON M, NORMAN P. The KIR gene cluster. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2003. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf
- CARTER JT, LEE CM, WEINSTEIN RJ, LU AD, DAFOE DC, ALFREY EJ. Evaluation of the older cadaveric kidney donor: the impact of donor hypertension and creatinine clearance on graft performance and survival. *Transplantation.* 2000; 70: 765-71
- CECKA JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transpl.* 1999; 1-21
- CHAUVEAU C, REMY S, ROYER PJ, HILL M, TANGUY-ROYER S, HUBERT FX, TESSON L, BRION R, BERIOU G, GREGOIRE M, JOSIEN R, CUTURI MC, ANEGON I. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood.* 2005; 106: 1694-702
- CHERTOW GM, BRENNER BM, MACKENZIE HS, MILFORD EL. Non-immunologic predictors of chronic renal allograft failure: data from the United Network of Organ Sharing. *Kidney Int Suppl.* 1995; 52: 48-51
- CINES DB, POLLAK ES, BUCK CA, LOSCALZO J, ZIMMERMAN GA, MCEVER RP, POBER JS, WICK TM, KONKLE BA, SCHWARTZ BS, BARNATHAN ES, MCCRAE KR, HUG BA, SCHMIDT AM & STERN DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998; 91: 3527-61
- COLONNA M, BROOKS EG, FALCO M, FERRARA GB, STROMINGER JL. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science.* 1993; 260: 1121-4
- COSIMI AB, BURTON RC, COLVIN RB, GOLDSTEIN G, DELMONICO FL, LAQUAGLIA MP, TOLKOFF-RUBIN N, RUBIN RH, HERRIN JT, RUSSELL PS. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation.* 1981; 32: 535-9
- DALLMAN MJ, WOOD KJ, HAMANO K. Cytokines and peripheral tolerance to alloantigen. *Immunol Rev.* 2002; 133: 5-18
- DALLMAN MJ. Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance. *Curr Opinion in Immunol.* 1993; 5: 788-93

-
- DAVIES MG, HAGEN PO. The vascular endothelium, a new horizon. *Ann Surg.* 1993; 218: 593-609
- DE GREEF KE, YSEBAERT DK, GHIELLI M, VERCAUTEREN S, NOUWEN EJ, EYSKENS EJ, DE BROE ME. Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *J Nephrol.* 1998; 11: 110-22
- DENTON MD, MAGEE CC, SAYEGH MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet.* 1999; 353: 1083-91
- DEUTSHCE STIFTUNG ORGANTRANSPLANTATION (DSO). <http://www.dso.de>
- DING R, Li B, MUTHUKUMAR T, DADHANIA D, MEDEIROS M, HARTONO C, SERUR D, SESHAN SV, SHARMA VK, KAPUR S, SUTHANTHIRAN M. CD103 mRNA levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts. *Transplantation.* 2003; 75: 1307-12
- EUROPEAN MULTICENTRE TRIAL. Cyclosporin A as sole immunosuppressive agent in recipients of kidney allografts from cadaver donors. Preliminary results of a European multicentre trial. *Lancet.* 1982; 2: 57-60
- EUROTRANSPLANT INTERNATIONAL FOUNDATION. Annual Report 2005. Eurotransplant. 2005.http://www.eurotransplant.nl/files/annual_report/AR2005_def.pdf
- FARMER DG, YERSIZ H, GHOBRIAL RM, MCDIARMID SV, GORMBEIN J, LE H, SCHLIFKE A, AMERSI F, MAXFILED A, AMOS N, RESTREPO GC, CHEN P, DAWSON S 3rd, BUSUTTIL RW. Early graft function after pediatric liver transplantation: comparison between in situ split liver grafts and living-related grafts. *Transplantation.* 2001; 72: 1795-802
- 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: 1937-1945
- GIBSON T, MEDAWAR PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat.* 1943; 77: 299-310
- GORER PA. The antigenic basis of tumour transplantation. *J Path Bacteriol.* 1938; 47: 231
- GRAMM HJ, MEINHOLD H, BICKEL U, ZIMMERMANN J, VON HAMMERSTEIN B, KELLER F, DENNHARDT R, VOIGT K. Acute endocrine failure after brain death? *Transplantation.* 1992; 54: 851-7
- GRIFFIN TA, NANDI D, CRUZ M, FEHLING HJ, KAER LV, MONACO JJ, COLBERT AA. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med.* 1998; 187: 97-104

-
- GULANIKAR AC, MACDONALD AS, SUNGURTEKIN U, BELITSKY P. The incidence and impact of early rejection episodes on graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants. *Transplantation*. 1992; 53: 323-8
- GUMPERZ JE, LITWIN V, PHILLIPS JH, LANIER LL, PARHAM P. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med*. 1995; 181: 1133-44
- HADLEY GA, ROSTAPSHOVA EA, GOMOLKA DM, TAYLOR BM, BARTLETT ST, DRACHENBERG CI, WEIR MR. Regulation of the epithelial cell-specific integrin CD103, by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Transplantation* 1999; 67: 1418–1425
- HADLEY GA, CHANRANDEE C, WEIR MR, WANG D, BARTLETT ST, DRACHENBERG CB. CD103+ CTL accumulate within the graft epithelium during clinical renal allograft rejection. *Transplantation* 2001; 72: 1548–1555
- HANCOCK WW, BUELOW R, SAYEGH MH, TURKA LA. Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med* 1998; 4: 1392-6
- HARIHARAN S, JOHNSON CP, BRESNAHAN BA, TARANTO SE, MCINTOSH MJ, STABLEIN D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med*. 2000; 342: 605-12
- HARIHARAN S, MCBRIDE MA, BENNETT LE, COHEN EP. Risk factors for renal allograft survival from older cadaver donors. *Transplantation*. 1997; 64: 1748-54
- HARMS J, ISEMER FE, KOLENDA H. Hormonal alteration and pituitary function during course of brain stem death in potential organ donors. *Transplantation*. 1993; 56: 363-6
- HATA Y, OZAWA M, TAKEMOTO SK, CECKA JM. HLA matching. *Clin Transpl*. 1996; 381-96
- HÄYRY P, VON WILLEBRAND E, PARTHENAIS E, NEMLANDER A, SOOTS A, LAUTENSCHLAGER I, ALFOLDY P, RENKONEN R. The inflammatory mechanisms of allograft rejection. *Immunol Rev*. 1984; 77:85-142
- HEEGER PS. T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am J Transplant*. 2003; 3: 525-33
- 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: 330-5
- HU H, AIZENSTEIN BD, PUCHALSKI A, BURMANIA JA, HAMAWEY MM, KNECHTLE SJ. Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction. *Am J Transplant*. 2004; 4: 432-7

- HUGHES CC, SAVAGE CO, POBER JS. The endothelial cell as a regulator of T-cell function. *Imm Rev.* 1990; 117: 85-102
- JOOSTEN SA, VAN KOOTEN, PAUL LC. Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transplant Int.* 2003; 16: 137-45
- KAIZU T, NAKAO A, TSUNG A, TOYOKAWA H, SAHAI R, GELLER DA, MURASE N. Carbon monoxide inhalation ameliorates cold ischemia/reperfusion injury after rat liver transplantation. *Surgery.* 2005; 138: 229-35
- KATORI M, BUELOW R, KE B, MA J, COITO AJ, IYER S, SOUTHARD D, BUSUTTIL RW, KUPIEC-WEGLINSKI JW. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation.* 2002; 73: 287-92
- KOHMOTO J, NAKAO A, STOLZ DB, KAIZU T, TSUNG A, IKEDA A, SHIMIZU H, TAKAHASHI T, TOMIYAMA K, SUGIMOTO R, CHOI AM, BILIAR TR, MURASE N, MCCURRY KR. Carbon Monoxide Protects Rat Lung Transplants From Ischemia-Reperfusion Injury via a Mechanism Involving p38 MAPK Pathway. *Am J Transplant.* 2007; 7: 2279-90
- KOO DD, WELSH KI, MCLAREN AJ, ROAKE JA, MORRIS PJ, FUGGLE SV. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int.* 1999; 56: 1551-1559
- LARSEN, CP, MORRIS, PJ, AUSTYN JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med.* 1990; 171: 307-14
- LEE CM, SCANDLING JD, PAVLAKIS M, MARKEZICH AJ, DAFOE DC, ALFREY EJ. A review of the kidneys that nobody wanted: determinants of optimal outcome. *Transplantation.* 1998; 65: 213-9
- LEE PC, TERASAKI PI, TAKEMOTO SK, LEE PH, HUNG CJ, CHEN YL, TSAI A, LEI HY. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation.* 2002; 74: 1192-4
- LI B, HARTONO C, DING R, SHARMA VK, RAMASWAMY R, QIAN B, SERUR D, MOURADIAN J, SCHWARTZ JE, SUTHANTHIRAN M. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme b in urine. *N Eng J Med.* 2001; 344: 947-54
- LIPMAN ML, STEVENS AC, STROM TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol.* 1994;152: 5120-7
- LIPPY P, TANAKA H. The pathogenesis of coronary arteriosclerosis ("chronic rejection") in transplanted hearts. *Clin Transplant.* 1994; 8: 313-18

-
- LIVI U, BORTOLOTTI U, LUCIANI GB, BOFFA GM, MILANO A, THIENE G, CASAROTTO D. Donor shortage in heart transplantation. Is extension of donor age limits justified? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994; 107: 1346-54
- LJUNGGREN HG, KARRE K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990; 11: 237-44
- MAUIYYEDI S, CRESPO M, COLLINS AB, SCHNEEBERGER EE, PASCUAL MA, SAIDMAN SL, TOLKOFF-RUBIN NE, WILLIAMS WW, DELMONICO FL, COSIMI AB, COLVIN RB. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 779-87
- MCNERNEY ME, LEE KM, ZHOU P, MOLINERO L, MASHAYEKHI M, GUZIOR D, SATTAR H, KUPPIREDDI S, WANG CR, KUMAR V, ALEGRE ML. Role of natural killer cell subsets in cardiac allograft rejection. *Am J Transplant.* 2006 6: 505-13
- MEDAWAR PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J Anat.* 1944; 78: 176-99
- MERRILL JP, MURRAY JE, HARRISON JH, GUILD WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *JAMA.* 1956; 160: 277-82
- MERTES PM. Physiology of brain death. *Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects*, TILNEY NL, STROM TB, PAUL LC, eds. Philadelphia, Lippincott, 1996; 275
- MISHRA S, FUJITA T, LAMA VN, NAM D, LIAO H, OKADA M, MINAMOTO K, YOSHIKAWA Y, HARADA H, PINSKY DJ. Carbon monoxide rescues ischemic lungs by interrupting MAPK-driven expression of early growth response 1 gene and its downstream target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 5191-6
- MORETTA A, BOTTINO C, PENDE D, TRIPODI G, TAMBUSI G, VIALE O, et al. Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med.* 1990; 172: 1589-98
- MORITA T, PERRELLA MA, LEE ME, KOUREMBANAS S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 1475-9
- MORRIS PJ, JOHNSON RJ, FUGGLE SV, BELGER MA, BRIGGS JD. Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA), *Lancet.* 1999; 354: 1147-52

- MULTICENTER TRIAL. Cyclosporin a as sole immunosuppressive agent in recipients of kidney allografts from cadaver donors. Preliminary results of a European multicentre trial. *Lancet*. 1982; 10: 57-60
- MUTHUKUMAR T, DING R, DADHANIA D, MEDEIROS M, Li B, SHARMA VK, HARTONO C, SERUR D, SESHAN SV, VOLK HD, REINKE P, KAPUR S, SUTHANTHIRAN M. Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2003; 75: 1565-70
- NANKIVELL BJ, FENTON-LEE CA, KUYPERS DR, CHEUNG E, ALLEN RD, O'CONNELL PJ, CHAPMAN JR. Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome. *Transplantation*. 2001; 71: 515-23
- NICHOLSON ML, METCALFE MS, WHITE SA, WALLER JR, DOUGHMAN TM, HORSBURGH T, FEEHALLY J, CARR SJ, VEITCH PS. A comparison of the results of renal transplantation from non-heart-beating, conventional cadaveric and living donors. *Kidney Int*. 2000; 58: 2585-91
- NICKEL P, LACHA J, ODE-HAKIM S, SAWITZKI B, BABEL N, FREI U, VOLK HD, REINKE P. Cytotoxic effector molecule gene expression in acute renal allograft rejection: correlation with clinical outcome; histopathology and function of the allograft. *Transplantation*. 2001; 72: 1158-60
- NOVITZKY D, COOPER DK, REICHART B. Hemodynamic and metabolic response to hormonal therapy in brain-dead potential organ donors. *Transplantation*. 1987; 43: 852-4
- NOVITZKY D, COOPER DK, ROSE AG. Injury of myocardial conduction tissue and coronary artery smooth muscle following brain death in the baboon. *Transplantation*. 1988; 45: 964-6
- NOVITZKY D, COOPER DK. Results of hormonal therapy in human brain-dead potential organ donors. *Transplant Proc*. 1988; 20: 59-62
- NOVITZKY D. Detrimental effects of brain death on the potential organ donor. *Trans. Proc*. 1997; 29: 3770-2
- ODE-HAKIM S, DOCKE WD, KERN F, EMMRICH F, VOLK HD, REINKE P. Delayed-type hypersensitivity-like mechanisms dominate late acute rejection episodes in renal allograft recipients. *Transplantation*. 1996; 61: 1233-40
- OPELZ G, DOHLER B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation*. 2007; 84: 137-43
- OTTERBEIN LE, BACH FH, ALAM J, SOARES M, TAO LH H, WYSK M, DAVIS RJ, FLAVELL RA, CHOI AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*. 2000; 6: 422-8

-
- PASCUAL M, THERUVATH T, KAWAI T, TOLKOFF-RUBIN N, COSIMI AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; 346: 580-90
- PAVLAKIS M, STREHLAU J, LIPMAN M, SHAPIRO M, MASLINSKI W, STROM TB. Intragraft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection. *Transplantation*. 1999; 27: 543-5
- PENA SV, KRENSKY AM. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol*. 1997; 9: 117-25
- PHILLIPS JH, GUMPERZ JE, PARHAM P, LANIER LL. Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science* 1995; 268: 403-5
- PIPKIN ME, LIEBERMANN J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19: 301-8
- POWER BM, VAN HEERDEN PV. The physiological changes associated with brain death: current concepts and implications for the treatment of the brain dead donor. *Anaesth Intensive Car*. 1995; 23: 26-36
- 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: 732-40
- PRATSCHKE J, WILHELM MJ, KUSAKA M, BASKER M, COOPER DK, TILNEY NL. Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplantation*. 1999; 67: 343-8
- PRATSCHKE J, WILHELM MJ, KUSAKA M, HANCOCK WW, TILNEY NL. Activation of donor proinflammatory genes as a consequence of brain death. *Trans Proc*. 1999; 31: 1003-5
- PRATSCHKE J, WILHELM MJ, LASKOWSKI I, KUSAKA M, BEATO F, TULLIUS SG, NEUHAUS P, HANCOCK WW, TILNEY NL. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12: 2474-81
- PYE J, ARDESSHIRPOUR F, MCCAIN A, BELLINGER DA, MERRICKS E, ADAMS J, ELLIOTT PJ, PIEN C, FISCHER TH, BALDWIN AS Jr, NICHOLS TC. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: 919-26
- REUTZEL-SELKE A, ZSCHOCKELT T, DENECKE C, BACHMANN U, JURISCH A, PRATSCHKE J, SCHMIDBAUR G, VOLK HD, NEUHAUS P, TULLIUS SG. Short-term immunosuppressive treatment of the donor ameliorates consequences of

- ischemia/ reperfusion injury and long-term graft function in renal allografts from older donors. *Transplantation*. 2003; 75: 1786-92
- RUGGERI L, CAPANNI M, URBANI E, PERRUCCIO K, SHLOMCHIK WD, TOSTI A, POSATIS, ROGAIA D, FRASSONI F, AVERSA F, MARTELLI MF, VELARDI A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002; 295: 2097-100
- RUSH D, JEFFERY J, TRPKOV K, SOLEZ K, GOUGH J. Effect of subclinical rejection on renal allograft histology and function at 6 months. *Transplant Proc*. 1996; 28: 494-5
- RUSH D, NICKERSON P, GOUGH J, MCKENNA R, GRIMM P, CHEANG M, TRPKOV K, SOLEZ K, JEFFERY J. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol*. 1998; 9: 2129-34
- RUSH DN, KARPINSKI ME, NICKERSON P, DANCEA S, BIRK P, JEFFERY JR. Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplant*. 1999; 13: 441-6. Review
- RYAN US. The endothelial surface and response to injury. *Fed Proc*. 1986; 45: 101-8
- SABEK O, DORAK MT, KOTB M, GABER AO, GABER L. Quantitative detection of T-cell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. *Transplantation*. 2002; 74: 701-7
- SAIKI T, EZAKI T, OGAWA M, MATSUNO K. Trafficking of host- and donor-derived dendritic cells in rat cardiac transplantation: allosensitization in the spleen and hepatic nodes. *Transplantation*. 2001; 71: 1806-15
- SCHEMMER P, SCHOONHOVEN R, SWENBERG JA, BUNZENDAHL H, RALEIGH JA, LEMASTERS JJ, THURMAN RG. Gentle organ manipulation during harvest as a key determinant of survival of fatty livers after transplantation in the rat. *Transpl Int*. 1999; 12: 351-9
- SCHNUELLE P, LORENZ D, MUELLER A, TREDE M, VAN DER WOUDE FJ. Donor catecholamine use reduces acute allograft rejection and improves graft survival after cadaveric renal transplantation. *Kidney Int*. 1999; 56: 738-746
- SEINO KI, FUKAO K, MURAMOTO K, YANAGISAWA K, TAKADA Y, KAKUTA S, IWAKURA Y, VAN KAER L, TAKEDA K, NAKAYAMA T, TANIGUCHI M, BASHUDA H, YAGITA H, OKUMURA K. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98: 2577-81
- SHARMA VK, BOLOGA RM, LI B, XU GP, LAGMAN M, HISCOCK W, MOURADIAN J, WANG J, SERUR D, RAO VK, SUTHANTHIRAN M. Molecular executors of cell death--differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and

- perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation*. 1996; 27: 1860-6
- SHEN XD, KE B, ZHAI Y, GAO F, BUSUTTIL RW, CHENG G, KUPIEC-WEGLINSKI JW. Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant*. 2005; 5: 1793-800
- SHOSKES DA, HALLORAN PF. Ischemic injury induces altered MHC gene expression in kidney by an interferon-gamma-dependent pathway. *Trans Proc*. 1991; 23: 599-601
- SHOSKES DA, PARFREY NA, HALLORAN PF. Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse. *Transplantation*. 1990; 49: 201-7
- SMITS JMA, DE MEESTER J, PERSIJN GG, CLASS FH, VANRENTERHEM Y. Long-term results of solid organ transplantation: report from the Eurotransplant International Foundation. Cecka JM, Terasaki PI, eds. *Clinical transplants*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1996: 109-27
- SOARES MP, LIN Y, ANRATHER J, CSIZMADIA E, TAKIGAMI K, SATO K, GREY ST, COLVIN RB, CHOI AM, POSS KD, BACH FH. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med*. 1998; 4: 1073-7
- SONG R, MAHIDHARA RS, ZHOU Z, HOFFMAN RA, SEOL DW, FLAVELL RA, BILIAR TR, OTTERBEIN LE, CHOI AM. Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol*. 2004; 172: 1220-6
- STARZL TE, PORTER KA, BRETTSCHEIDER L, PENN I, BELL P, PUTNAM CW, MCGUIRE RL. Clinical and pathological observations after orthotopic transplantation of the human liver. *Surg Gynecol Obstet*. 1969; 128: 327-39
- STREHLAU J, PAVLAKIS M, LIPMAN M, SHAPIRO M, VASCONCELLOS L, HARMON W, STROM TB. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 695-700
- 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: 1533-42
- TATAPUDI RR, MUTHUKUMAR T, DADHANIA D, DING R, LI B, SHARMA VK, LOZADA-PASTORIO E, SEETHARAMU N, HARTONO C, SERUR D, SESHAN SV, KAPUR S, HANCOCK WW, SUTHANTHIRAN M. Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int*. 2004; 65: 2390-7

-
- TENHUNEN R, MARVER HS, SCHMID R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med.* 1970; 75: 410-21
- 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: 333-6
- TERASAKI PI, OZAWA M. Predicting graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant.* 2004; 4: 438-43
- TERASAKI PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant.* 2003; 3: 665-73
- TESAR BM, GOLDSTEIN DR. Toll-like receptors and their role in transplantation. *Front Biosci.* 2007; 12: 4221-38. Review
- TILNEY NL, WHITLEY WD, TULLIUS SG, HEEMANN UW, WASOWSKA B, BALDWIN WM 3rd, HANCOCK WW. Serial analysis of cytokines, adhesion molecule expression, and humoral responses during development of chronic kidney allograft rejection in a new rat model. *Transplant Proc.* 1993; 25: 861-2
- TILNEY NL, WHITLEY WD, DIAMOND JR, KUPIEC-WEGLINSKI JW, ADAMS DH. Chronic rejection--an undefined conundrum. *Transplantation.* 1991; 52: 389-98. Review.
- TULLIUS SG, NIEMINEN-KELHA M, BUELOW R, REUTZEL-SELKE A, MARTINS PN, PRATSCHKE J, BACHMANN U, LEHMANN M, SOUTHARD D, IYER S, SCHMIDBAUER G, SAWITZKI B, REINKE P, NEUHAUS P, VOLK HD. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation.* 2002; 74: 591-8
- TULLIUS SG, HEEMANN U, HANCOCK WW, AZUMA H, TILNEY NL. Long-term kidney isografts develop functional and morphological changes that mimic those of chronic allograft rejection. *Ann Surg.* 1994; 220: 425-32
- TULLIUS SG, REUTZEL-SELKE A, EGERMANN F, NIEMINEN-KELHA M, JONAS S, BECHSTEIN WO, VOLK HD, NEUHAUS P. Contribution of prolonged ischemia and donor age to chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 1317-24
- TULLIUS SG, TILNEY NL. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation.* 1995; 59: 313- 8
- TULLIUS SG, VOLK HD, NEUHAUS P. Transplantation of organs from marginal donors. *Transplantation.* 2001; 72: 1341-9

-
- UNOS: UNITED NETWORK FOR ORGAN SHARING 2000. Annual Report of the U.S. Scientific Registry for Transplant Recipients and the Organ and Transplantation Network. UNOS Richmond 2000
- VAN DER HOEVEN JA, TER HOST GT, MOLEMA G, DE VOS P, GIRBES AR, POSTEMA F, FREUND RL, WIERSEMA J, VAN SCHILFGAARDE R, PLOEG RJ. Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunological activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg.* 2000; 232: 804-13
- VASCONCELLOS LM, SCHACHTER AD, ZHENG XX, VACONCELLOS LH, SHAPIRO M, HARMON WE, STROM TB. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation.* 1998; 66: 562-6
- VIKLICKY O, MATL I, VOSKA L, BOHMOVA R, JARESOVA M, LACHA J, LODEREROVA A, STRIZ I, TEPLAN V, VITKO S. TGF-beta1 expression and chronic allograft nephropathy in protocol kidney graft biopsy. *Physiol Res.* 2003; 52: 353-60
- WICOMB WN, COOPER DK, LANZA RP, NOVITZKY D, ISAACS S. The effects of brain death and 24 hours' storage by hypothermic perfusion on donor heart function in the pig. *J Thoc Cardiovasc Surg.* 1986; 91: 896
- WILHELM MJ, PRATSCHKE J, BEATO F, TAAL M, KUSKA M, HANCOCK WW, TILNEY NL. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation.* 2000; 102: 2426-33
- ZHAI Y, SHEN XD, O'CONNELL R, GAO F, LASSMAN C, BUSUTTIL RW, CHENG G, KUPIEC-WEGLINSKI JW. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol.* 2004; 173: 7115-7119
- ZWIRNER NW, MARCOS CY, MIRBAHA F, ZOU Y, STASTNY P. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol.* 2000; 61: 917-24

7. Abkürzungsverzeichnis

APC	antigen-presenting cell
CAN	chronic allograft nephropathy
CCL19	(C-C motif) ligand 19
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CsA	Cyclosporin A
CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3
DC	dendritic cells
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
FASL	FAS ligand
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HO-1	Hämoxygenase 1
IP-10	(C-X-C motif) ligand 10
KIR	killer-cell immunoglobulin-like receptor
mRNA	messenger
MHC	major histocompatibility complex
NK	natural killer cell
RT-PCR	reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaktion
TGF β	transforming growth factor β
Th1	T-Helfer Zellen vom Typ 1
UNOS	United Network for Organ Sharing

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Volk, Direktor des Institutes für Medizinische Immunologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, danke ich für seine stets großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit, für zahlreiche Anregungen, für die Betreuung meiner Arbeit sowie für stets fruchtbare und weiterführende Diskussionen. Besonders danken möchte ich auch meinen klinischen Kooperationspartnern, insbesondere PD. Dr. med. Johann Pratschke (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie Charité), Prof. Dr. med. Stefan Tullius (Brigham and Women's Hospital, Boston, USA) und Prof. Dr. med. Petra Reinke (Klinik für Nephrologie und intern. Intensivmedizin, Charité) ohne deren unermüdliche Hilfe und Ratschläge die Durchführung der Projekte sicherlich nicht möglich gewesen wäre. Danken möchte ich insbesondere meinen Mitarbeitern Diana Stauch, Roman Klemz, Mir-Farzin Mashreghi, Mareen Matz, Marleen Seiler, Cam-Tien Le, Katrin Klippert und Kristina Kunert für die fruchtbare und erfolgreiche Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren sowie besonders Annelie Dernier für ihre technische Unterstützung. Den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Immunologie gilt mein Dank für die kooperative Zusammenarbeit in dieser Zeit. Frau Dr. rer. nat. Constanze Schönemann (HLA-Labor, Abteilung für Transfusionsmedizin der Charité) hat meine wissenschaftliche Laufbahn stets mit großem Engagement begleitet, wofür ich ihr ebenfalls danke. Mein herzlicher Dank gilt allen nationalen und internationalen Kooperationspartnern für den intensiven wissenschaftlichen Austausch, die stimulierenden Diskussionen und die anregende Kritik.

Schließlich gilt mein Dank der Charité, Universitätsmedizin Berlin, für die wissenschaftliche und persönliche Förderung meiner Arbeit durch die Gewährung eines Rahel-Hirsch Habilitationsstipendiums sowie durch die Aufnahme in das Mentorenprogramm der Charité.

Der Dank, den ich meiner Familie für ihre Unterstützung schulde, lässt sich nicht in Worte fassen.

9. Eidesstattliche Erklärung

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift