

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss verlängerter Ischämie
auf Nierentransplantatfunktion
und antigen-abhängige Immunantwort
nach Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité –Universitätsmedizin Berlin

von

Paul Brandenburg
aus Berlin

Gutachter: 1. PD Dr. med. Johann Pratschke
2. Prof. Dr. med. Klemens Budde
3. PD Dr. med. Markus Wilhelm

Datum der Promotion: 7. November 2008

Hermann F. P. Brandenburg
und Nikolaus Schimpf
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1. Kurze Geschichte der Nierentransplantation	3
1.2. Aktuelle Epidemiologie	4
1.3. Faktoren langfristiger Transplantatfunktion	6
1.4. Therapeutischer Einsatz monoklonaler Antikörper	8
2. Stand der Forschung und Fragestellung	9
2.1. Antigen-abhängige Immunantwort CD4+ T-Zellen	9
2.2. Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern (mAk).....	13
2.3. Der Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden)	16
2.4. Fragestellung	19
3. Material und Methoden	20
3.1. Versuchsaufbau	20
3.2. Versuchsgruppen.....	20
3.3. CTLA4-Ig: Eigenschaften und Dosis.....	23
3.4. Versuchstiere	23
3.5. Bestrahlung der Empfänger von Stufe II.....	24
3.6. Operation, Applikation und Probenentnahme	24
3.7. Auswertungsverfahren.....	30
3.8. Material	37
4. Ergebnisse	40
4.1. Ein-/Ausschlusskriterien und Kontrolltiere	40
4.2. Überleben	40
4.3. Proteinurie	42
4.4. Kreatinin-Clearance	43
4.5. Histomorphologie.....	44
4.6. Immunhistochemie.....	52
4.7. Durchflusszytometrische Untersuchung (FACS)	55
4.8. ELISA der leukozytären Zytokinexpression	61
4.9. ELISPOT-Assay der leukozytären IFN- γ -Expression	63
5. Diskussion	65
6. Zusammenfassung	76
7. Literaturverzeichnis	78

8. Glossar.....	91
9. Publikationsverzeichnis	93
10. Danksagung	94
11. Lebenslauf	95
12. Eidesstattliche Erklärung.....	96

1. Einleitung

1.1. Kurze Geschichte der Nierentransplantation

Der erste erfolgreiche Versuch einer Nierentransplantation wird dem deutschen Chirurgen Emerich Ullmann (Wien) zugeschrieben. Er veröffentlichte im Jahr 1902 eine Arbeit über experimentelle Nierentransplantationen an Hunden. Drei Jahre später gelang es Alex Carrell die Anastomosetechnik entscheidend zu verfeinern und so die chirurgische Voraussetzung für den zukünftigen Einsatz am Menschen zu schaffen – seine Technik findet nahezu unverändert bis heute Anwendung (1). 1906 führte Mathieu Jaboulay dann erstmals eine technisch erfolgreiche Transplantation einer Schweineniere bei einem niereninsuffizienten Patienten durch, der jedoch unter der Therapie verstarb.

1954 schließlich verpflanzte ein Team um Joseph Murray, John Merrill und Hartwell Harrison am Peter Bent Brigham Hospital in Boston erstmalig therapeutisch erfolgreich eine Niere zwischen den eineiigen Zwillingen Ronald und Richard Herrick. Der Empfänger Richard überlebte 9 Jahre, ehe er an einem Rezidiv seiner Grunderkrankung verstarb. Trotz der frühzeitigen Entwicklung der chirurgisch-technischen Voraussetzungen verstarben die Transplantatempfänger jahrzehntelang wenige Wochen nach der Operation – man sprach in Unkenntnis der genauen Mechanismen von einer biologischen Kraft, die eine Annahme des fremden Organs verhindere (2).

1945 zeigte der Immunologe Peter Medawar aus Oxford schließlich, dass die Abstoßung eines Transplantats Folge einer aktiven Immunisierung ist; 1960 erhält er für diese Entdeckung den Nobelpreis. Erst 1958 machten französische Forscher das Vorhandensein zellulärer Oberflächenantigene, die interindividuell verschieden sind, als Grund der Gewebeunverträglichkeiten aus. Im gleichen Jahr prägte der Immunologe Jean Dausset den Begriff vom *Humanen Leukozyten-Antigen* (HLA).

Vor dem Aufkommen einer rationalen Immuntherapie versuchte Murray 1959 durch Ganzkörperbestrahlung von Empfängern Allotransplantationen von Nieren möglich zu machen. Bis auf einen verstarben alle von zwölf Patienten an den Folgen dieses aggressiven Therapieansatzes.

1961 schließlich wurde das Zytostatikum Azathioprin als erstes Immunsuppressivum klinisch eingesetzt und, ein Derivat von 6-Mercaptourin, dessen immunsuppressive Potenz kurz zuvor entdeckt wurde. 1962 wurde Azathioprin in Boston erstmals im Rahmen einer Studie zur Therapie verwendet. Murray gelang es dabei erstmals ein Langzeit-

überleben eines Patienten mit dem Nierenallotransplantat eines toten Spenders zu erreichen. Für seine Verdienste um die Transplantationsmedizin verlieh die Schwedische Akademie Joseph Murray 1990 den Nobelpreis. Durch Anwendung von Azathioprin erreichten die Einjahresüberlebensraten der Transplantate Anfang der sechziger Jahre in den USA Werte von knapp 50%. Die sog. Azathioprin-Ära währte bis Anfang der 1980er: Mit Azathioprin als alleinigem Immunsuppressivum stagnierten die Einjahresüberlebensraten der Spenderorgane bald bei 60%.

Mit der Einführung zusätzlicher niedrig dosierter Corticoidgabe konnte gegen Anfang eine Besserung des Einjahres-Patientenüberlebens auf 90% erreicht werden. Die Einjahresüberlebensrate der Spenderorgane blieb jedoch bei 60%.

Um 1983 hielt der Calcineurininhibitor Cyclosporin A (CyA) Einzug in die Klinik und half, die Einjahresüberlebensrate der Transplantate auf über 80% zu erhöhen. CyA als Standardmittel folgten bis heute eine Vielzahl ähnlich wirksamer Pharmaka verschiedener Klassen: Tacrolimus und Rapamycin/Sirolimus (ebenfalls Calcineurininhibitoren), Mycophenolat Mofetil (ein Zytostatikum) und verschiedene monoklonale Antikörper gegen T-Zell-Rezeptoren. Ihr kombinierter Einsatz und die Optimierung der perioperativen Versorgung ermöglichten es, die Rate des Einjahresüberlebens der Spenderorgane auf heute 92% zu steigern (3).

1.2. Aktuelle Epidemiologie

Die Nierentransplantation (NTx) ist heute Therapie der Wahl bei terminaler Niereninsuffizienz. In den USA (~291 Mio. Einw.) lebten im Jahr 2004 ca. 101.404 Einwohner mit transplantierten Nieren. Jährlich kommen ca. 15.000 hinzu. Auch im Versorgungsbe- reich von Eurotransplant (~120 Mio. Menschen) wurden im vergangenen Jahr 4247 Nie- ren (inkl. kombinierter Tx) transplantiert (4). Die Niere ist damit vor der Leber (USA 2004: 5.780 LTx) das am häufigsten transplantierte parenchymatöse Organ (5).

Die Verbesserung von Operationstechnik und immunsuppressiver Therapie brachten große Erfolge: Das Einjahresüberleben der *Patienten* liegt aktuell bei 99,1% im Fall ei- ner Lebendspende (LD) bzw. 97,6% bei Leichenspende (DD). Die Einjahres- Überlebensrate transplantierte Organe beträgt 95,1% (LD), respektive 89,0% (DD) (6). Nierentransplantierte Patienten weisen damit eine niedrigere Mortalität auf, als Patien- ten auf der Warteliste (7). Wie Jofre und Kollegen nachwiesen, bietet die NTx dem Pati-

enten gegenüber der Dialyse eine deutlich bessere Lebensqualität (8). Auch ist sie die kostengünstigere Alternative der beiden Therapieformen bei terminaler Niereninsuffizienz (9). Aufgrund dieser Umstände wird die Indikation zur NTx zunehmend häufiger gestellt.

Bei allen Fortschritten bestehen nach wie vor zwei Hauptprobleme: Ein ungenügendes Langzeitüberleben und der anhaltende Mangel an geeigneten Transplantaten (10). Die Zehnjahresrate des Empfängerüberlebens stagniert bei rund 40 Prozent (11, 12).

Gleichzeitig ist die Spendebereitschaft unverändert niedrig, während die Inzidenz der NTx-pflichtigkeitsbedingenden Grundkrankheiten weiter steigt. In den westlichen Ländern sind dies vor allem die glomeruläre Nephropathie und der Diabetes mellitus. Resultat ist ein wachsendes Defizit geeigneter Transplantate.

Betrug die Listenwartezeit nach Meldung zur NTx in den USA 1995 durchschnittlich 918 Tage (Median), lag sie 2001 bereits bei 1128 (6). Dieser Entwicklung wurde mit einer Ausweitung der Verwendungskriterien für Transplantatorgane begegnet:

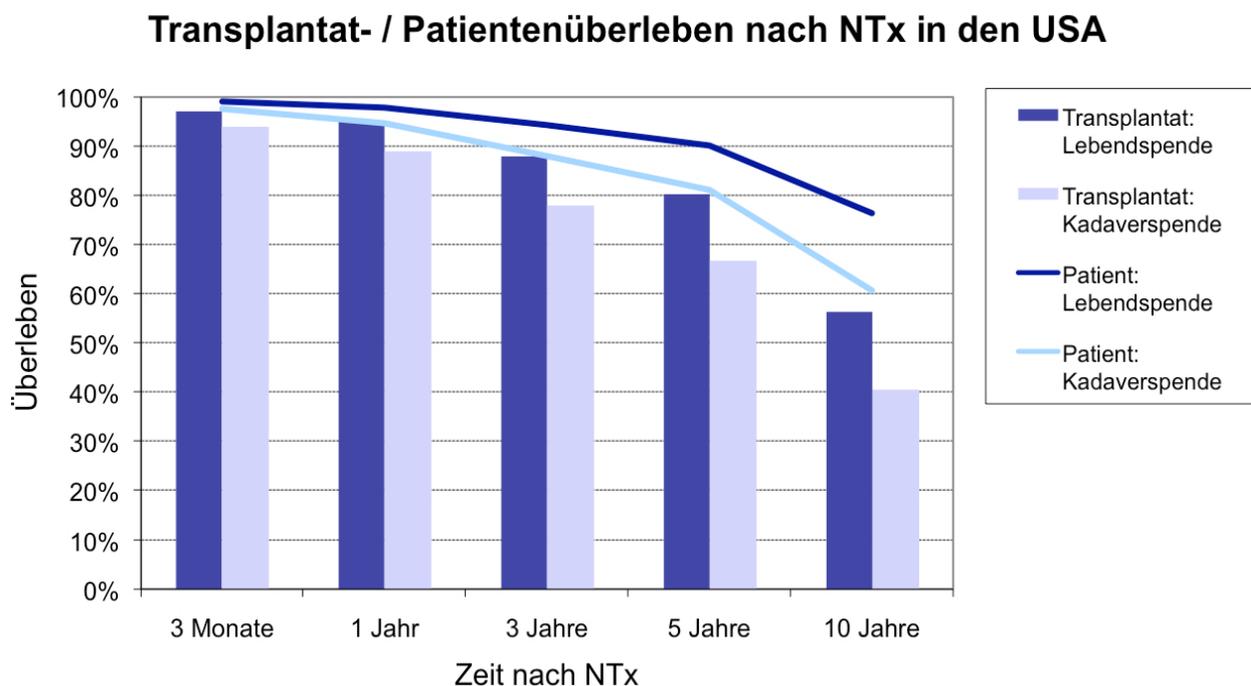


Abbildung 1. Postoperatives Überleben von Transplantat (*Balken*) und Empfänger (*Linie*) nach Nierentransplantation in den USA; Werte korrigiert um erwartete Mortalität. Datenlage August 2005: *Quelle: US Transplant – Scientific Registry of Transplant Recipients. 2005 OPTN/SRTR Annual Report*

Ein Teil ehemals als ungeeignet klassifizierter Nieren werden dabei als *marginale Spenderorgane* für *Expanded Donor Criteria* Transplantationen (EDC) verwendet (13, 14). Der Begriff marginaler Organe ist nicht abschließend definiert, bezeichnet jedoch Organe, deren Alter oder Ischämiezeit außerhalb der als optimal angesehenen Norm liegen. Mit ihnen konnte der Anteil neurekrutierter Transplantate bis zum Jahr 2002 auf 15% des Gesamttransplantataufkommens gesteigert werden.

1.3. Faktoren langfristiger Transplantatfunktion

Nach entscheidenden Fortschritten bei der Therapie akuter Abstoßung steht heute die chronische Transplantatdysfunktion als limitierender Faktor des postoperativen Überlebens im Vordergrund; sowohl des Transplantats als auch des Empfängers (15, 16).

Faktoren der *Chronic Allograft Nephropathy* (CAN)

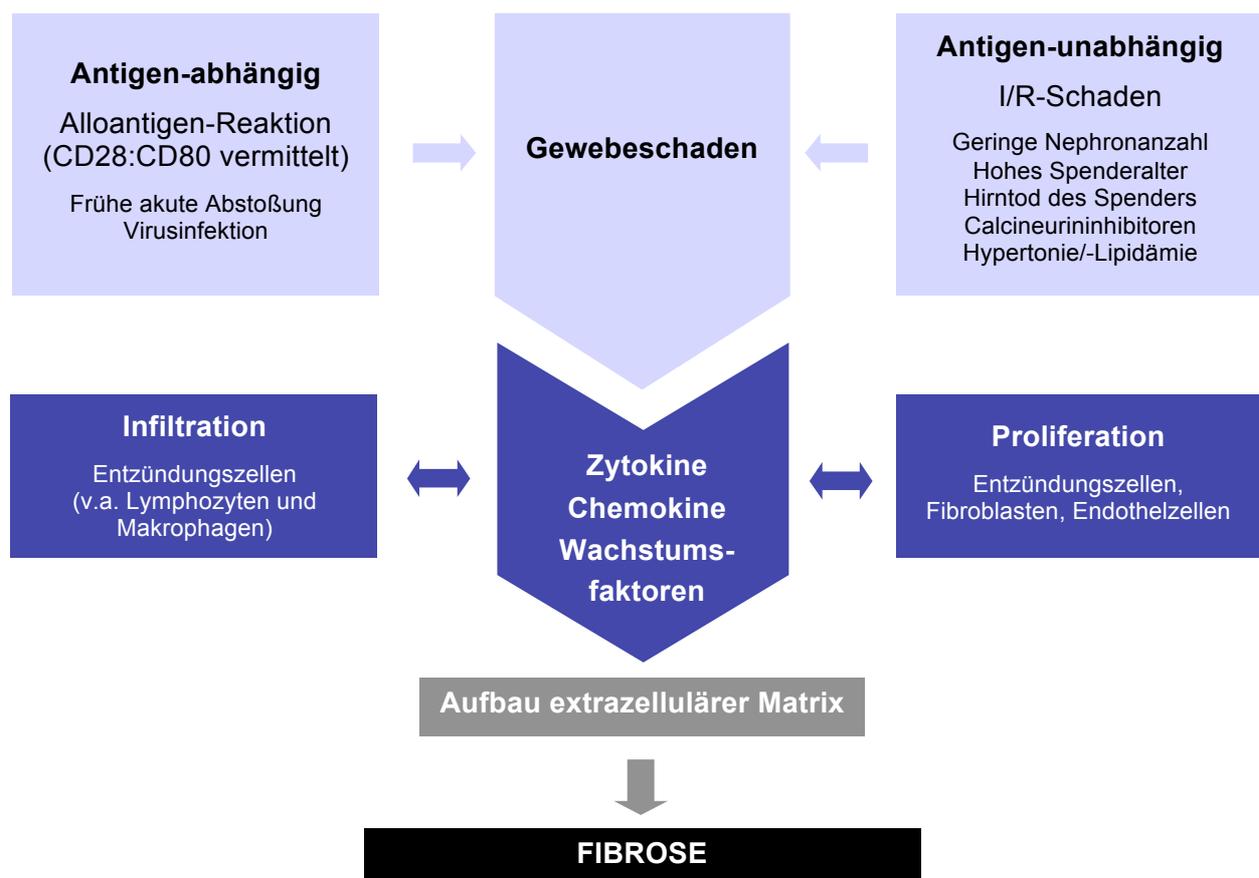


Abbildung 2. Schema pathogener Wechselwirkungen im Rahmen der *Chronic Allograft Nephropathy*. Erläuterung siehe Text. *Modifiziert nach: Manon RB. Am J Transplant 2006; 6: 867-75*

Regelmäßige morphologische Korrelate sind interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie in der Spenderniere (17). Dieser Zustand stellt die gemeinsame Endstrecke einer Vielzahl schädigender Prozesse dar und wird zusammenfassend als *Chronic Allograft Nephropathy* (CAN) bezeichnet. Mit einer Biopsieprävalenz von 60-70% ist CAN die häufigste Diagnose eines späten (>10 Jahre post NTx) Transplantatverlustes (18).

CAN ist ein pleomorphes Krankheitsbild, das einhergeht mit der Funktionsverschlechterung der Transplantatniere, einer Abnahme ihrer glomerulären Filtrationsrate und einer Proteinurie. Am Ende steht der Verlust des Transplantates infolge einer Fibrosierung. Anhand typischer Biopsiebilder können im Verlauf der CAN zwei Phasen unterschieden werden: Der Großteil des tubulo-interstitiellen Schadens stellt sich bereits kurz nach Transplantation ein (19, 20). Er wird als Folge des Ischämie-Reperfusionsschadens, akuter und subklinischer Abstoßung und der CNI-Toxizität angesehen. Chronisches subklinisches Entzündungsgeschehen und die CNI-Toxizität sorgen auf seinem Boden für ein Fortschreiten des tubulären Schadens.

Langfristig kommt es zum entzündlichen Umbau von Arteriolen und Glomeruli und schließlich zum fibrotischen Untergang des Transplantates (21, 22). Ursächlich für CAN ist eine Kumulation spezifischer (antigen-abhängiger) und unspezifischer (antigen-unabhängiger) Schädigungsfaktoren.

Als antigen-abhängige Faktoren der Immunreaktion werden betrachtet:

- Chronische Abstoßung nach Antigen-Erkennung (bedarf der Costimulation)
- Episoden früher akuter Abstoßung
- Virusinfektionen (v.a. mit Polyoma- (HPV) und Zytomegalieviren (CMV)).

Als antigen-unabhängig kommt insbesondere der Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) hinzu. Sein Ausmaß wird bestimmt von der Latenz zwischen Organentnahme und Reperfusion im Empfänger. Situationsabhängig können weitere antigen-unabhängige Schädigungsfaktoren hinzukommen: die Nephrotoxizität von Immunsuppressiva (Calcineurininhibitoren), eine unzureichende Nephronanzahl (bei geringer Nierenmasse), hohes Spenderalter sowie arterielle Hypertonie und Hyperlipidämie. Eine eigene Wirkung entfaltet der Hirntod des Spenders: Pratschke und Kollegen zeigten, dass seine systemischen Folgen antigen-unabhängige Schädigungen des Transplantates bewirken (23).

1.4. Therapeutischer Einsatz monoklonaler Antikörper

Moderne Immunsuppressiva haben die Inzidenz akuter Abstoßung erheblich reduziert, jedoch wenig Verbesserung in Bezug auf die CAN und das Langzeitüberleben gebracht. Hauptursachen hierfür sind eine fehlende Wirkungsselektivität immunsuppressiver Pharmaka und ihre beträchtliche Toxizität.

Entscheidenden Fortschritt könnte die Verwendung monoklonaler Antikörper (mAk) zur Inhibition der Costimulation von T-Zellen bringen. Im Rahmen der immunsuppressiven Erhaltungstherapie nach Organtransplantation könnte mit ihnen der Einsatz von CNI und damit verbundene Nebenwirkungen vermieden oder verringert werden. Die Wirkung solcher mAk beruht auf der Notwendigkeit einer Costimulation von CD4-positiven T-Zellen bei Initiierung der Abstoßungsreaktion. Die Blockade der Costimulation, beispielsweise durch CTLA4-Ig, hat sich als vielversprechender Ansatz herausgestellt: Nach Ausbleiben einer T-Zellaktivierung kann sich über einen unbekanntem Mechanismus eine stabile (dominante) Allotransplantattoleranz entwickeln. Sie wird getragen von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen (Tregs). Tregs wirken dabei einerseits hemmend auf die Aktivierung antigen-spezifische CD4+ T-Zellen, andererseits inhibieren sie direkt die Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL).

In verschiedenen Tiermodellen konnte CTLA4-Ig erfolgreich zur Induktion einer Empfängertoleranz eingesetzt werden (7). Auch in klinischen Studien konnte eine signifikante Verbesserung der Transplantatfunktion durch ergänzende Gabe von CTLA4-Ig beobachtet werden. Bisher sind die klinischen Ergebnisse jedoch vorläufig; auch fehlen aussagekräftige Phase III-Studien. Trotz ermutigender Ansätze bleibt eine therapeutische Toleranzinduktion daher das Fernziel. Es zu erreichen, bedarf es eines genaueren Verständnisses der Interaktionen von CTLA4-Ig mit der antigen-abhängigen Immunantwort. Andererseits gilt es, die zusätzliche Auswirkung antigen-unabhängiger Schädigungsfaktoren auf diesen Immunvorgang zu verstehen, die in der Klinik regelmäßig hinzukommen. Dies ist insbesondere der Ischämie-Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) (8) Über seinen Einfluss auf die antigen-abhängige Immunantwort nach Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig liegen bisher keine Untersuchungen vor

2. Stand der Forschung und Fragestellung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Modulation antigen-abhängiger Abstoßungsmechanismen durch den monoklonalen Antikörper CTLA4-Ig und ihre Beeinflussung durch eine verlängerte Ischämie des Transplantates. Die Darstellung des Forschungsstandes beschränkt sich auf die hierfür unmittelbar relevanten Aspekte der Transplantationsimmunologie.

2.1. Antigen-abhängige Immunantwort CD4+ T-Zellen

2.1.1. Signal 1 - Erkennung von Alloantigenen

Bei der antigen-abhängigen Immunreaktion auf Allotransplantate (allogen=genetisch verschiedene Individuen gleicher Spezies) interagieren eine Vielzahl Immunzelltypen: Antigenpräsentierende Zellen (APC), T-Helferzellen (TH1 und 2), zytotoxische T-Zellen (CTL), natürliche Killer-Zellen und B-Zellen (24). Über verschiedene Pfade vermitteln sie die pathomechanischen Komponenten der CAN. Die Initiierung dieser Kaskaden hat eine gemeinsame Vorbedingung: Die Aktivierung antigen-spezifischer CD4+ T-Zellen.

Die Unterscheidung zwischen Allo- und Eigenantigen und die konsekutive Aktivierung von T-Lymphozyten beruht auf der Interaktion von Zelloberflächenmolekülen. Wichtigstes Molekül ist der Rezeptor des Major Histocompatibility Complex II (MHC II), auf der Membran antigenpräsentierender Zellen. Lederberg konnte 1959 zeigen, dass MHC-Antigene nach Reifung des Immunsystems den stärksten Aktivierungsstimulus alloantigen-spezifischer T-Zellen darstellen (25). An MHC II präsentieren APC phagozytiertes Antigen. Der ruhende T-Lymphozyt bindet es mit seinem T-Zell-Rezeptor (CD3 / TCR) und erhält das erste Aktivierungssignal (Signal 1) (26, 27, 28). Eine solche Präsentation kann über verschiedene Signalwege erfolgen.

Im direkten Signalweg (*direct pathway*) werden intakte, spendereigene Klasse I und II MHC Moleküle auf der Oberfläche spendereigener APC durch CD8+ und CD4+ Zellen des Empfängers erkannt. Im indirekten Signalweg (*indirect pathway*) werden MHC I und II Antigene des Spenders durch APC des Empfängers präsentiert und von empfänger-eigenen CD8+ und CD4+ Zellen erkannt. Das T-Zellrepertoire umfasst eine große Anzahl von Zellen, die über den direkten Signalweg unmittelbar alloreaktiv wirken und eine vergleichsweise kleine Zahl von Zellen, die über den indirekten Weg aktiviert werden. Es wird daher angenommen, dass direkte Alloreaktivität verantwortlich ist für Episoden

akuter Abstoßung, während der indirekte Signalweg hauptverantwortlich sein soll für späte Abstoßung im Rahmen der *Chronic Allograft Nephropathy*. Als Bindeglied zwischen diesen beiden Wegen wurde ein dritter, semi-direkter Signalweg postuliert. Über ihn sollen empfängereigene Dendritische Zellen (DC) MHC Moleküle von Spenderzellen aufnehmen und direkt empfangereigenen T-Zellen präsentieren. Es wird allgemein angenommen, dass alloreaktive CD4+ und CD8+ T-Zellen, die spezifisch sowohl für den direkten als auch den indirekten Signalweg sind, den Prozess der Abstoßung verantworten. Hingegen scheinen CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen (spezifisch für den direkten Signalweg) eine wichtige Rolle beim Aufbau einer Allotransplantattoleranz zu spielen.

2.1.2. Signal 2 - Costimulation durch CD28:CD86/80

Neben Signal 1 benötigt der ruhende T-Lymphozyt mindestens ein weiteres, aktivierendes Signal. Er erhält es durch Bindung eines costimulatorischen Liganden der APC (29, 30, 31, 32).

Das erste costimulatorische Rezeptor-Ligandenpaar wurde von Jenkins et al. beschrieben: Als T-zellseitigen Rezeptor identifizierten sie CD28, ein transmembranöses Glycoprotein. Es wird beim Menschen konstitutiv von der Mehrzahl CD4+ Zellen und von ca. 50% der CD8+ Zellen exprimiert (33). Als APC-seitige Liganden wurden CD86 (synonym: B7.2) und später CD80 (B7.1) ausgemacht. Ihre Bindungen vermitteln jeweils ein positives Signal 2. Folge der Aktivierung ist letztlich die klonale Expansion antigenspezifischer T-Zellen und eine Hemmung ihrer Apoptose durch Anregung der Synthese anti-apoptotischer Moleküle. Gleichzeitig wird die Sekretion aktivierender Zytokine gesteigert und die T-Zellklone zur Differenzierung in T-Helferzellen (TH) stimuliert. Die Bindung von CD28 regt zudem die Antikörperproduktion durch B-Zellen an und stimuliert bereits aktivierte T-Zellen zusätzlich (34).

Auch stimuliert eine Bindung von CD86/80 an CD28 bei Dendritischen Zellen (DC) die Synthese von IL-6 und hemmt den immunsuppressiv wirkenden Abbau von Tryptophan (35). Über einen unbekanntem Mechanismus steuert es diese Bindung, zudem die intrathymische Differenzierung und periphere Homöostase CD4+CD25+ regulatorischer T-Zellen (Tregs).

T-Zell-Aktivierung bei Costimulation über CD28:CD86/80

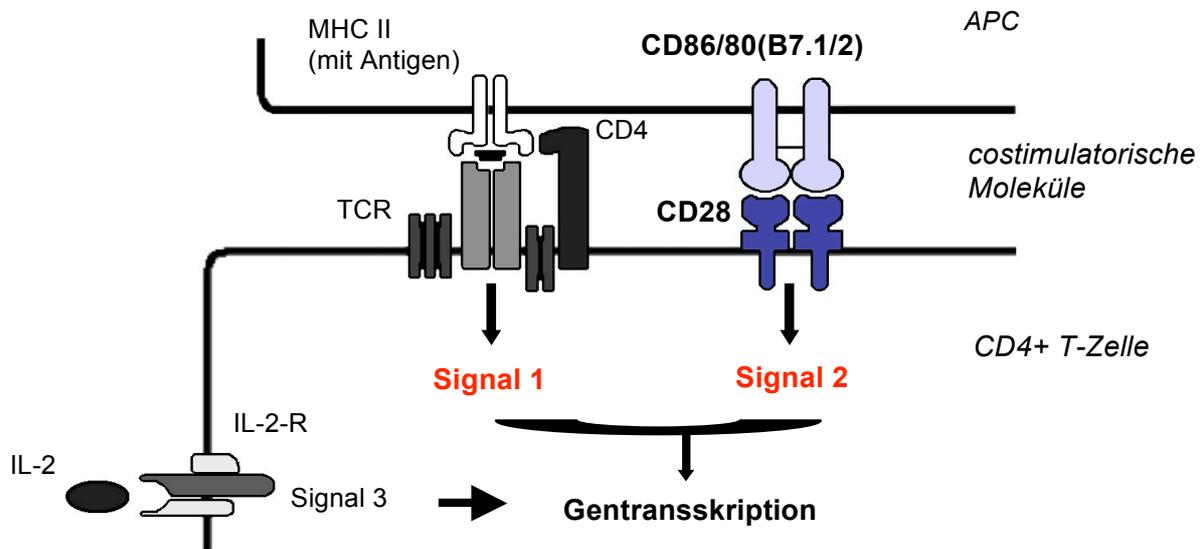


Abbildung 3. Aktivierung von CD4+ T-Zellen bei Costimulation via CD28:CD80/CD86-Signalweg; Erläuterung siehe Text. *Modifiziert nach: Clarkson MR, Sayegh MH. Transplantation 2005; 80: 555-63*

2.1.3. Blockade der Costimulation durch CTLA4

Kurz nach Beschreibung des Molekülpaars CD28:CD86/80 entdeckten Linsley und Kollegen einen weiteren Bindungspartner von CD86/80: das zytotoxische T-Lymphozytenantigen 4 (CTLA4), später als CD152 klassifiziert (36). CTLA4 hat eine 10-20fach stärkere Bindungsaffinität zu CD86/80 (B7.2/1) als das T-zellständige CD28. So wird es von CD28 kaum kompetitiv verdrängt. CTLA4 ist zu ca. 30% strukturhomolog mit CD28 und wird in vivo unmittelbar nach T-Zell-Aktivierung exprimiert (37). Anders als CD28 liefert CTLA4 der CD4+ T-Zelle jedoch ein inhibierendes Signal. Die T-Zelle wird dadurch in ihrer Synthese von IL-2 und dem IL-2-Rezeptor gehemmt und in der G1-Phase arretiert (38). Auf diese Weise inhibiert CTLA4 die Aktivierung sowohl naiver als auch aktivierter CD4+ und CD8+ T-Zellen. Auf CD8+-positive Zellen ist die Wirkung allerdings signifikant schwächer (39). Eine wichtige Rolle spielt CTLA4 zudem bei der Differenzierung regulatorischer T-Zellen (Tregs): Durch Bindung von CD80 und CD86 induziert CTLA4 in Dendritischen Zellen die Expression von Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO). IDO ist ein tryptophan-abbauendes Enzym, das in vitro inhibierend auf die antigen-abhängige Proliferation von Tregs wirkt. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus auch in vivo bedeutsam ist (40).

2.1.4. Die Funktion regulatorischer T-Zellen (Tregs) nach Allotransplantation

Es wird allgemein angenommen, dass regulatorische T-Zellen (Tregs) von entscheidender Bedeutung sind für Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Antigen-toleranz. Zur Klasse der Tregs gehören u.a. CD4⁺, CD8⁺, und CD4-CD8⁻ T-Zellen, wobei CD4⁺ T-Zellen den größten Anteil ausmachen und ca. 5-15% der Population CD4⁺ T-Zellen stellen (41, 42). Tregs besitzen immunsuppressive Eigenschaften und zeichnen sich durch immunologische Anergie aus; ein Zustand definiert als Hyporeaktivität gegenüber Aktivierungssignalen. Im Zustand der Anergie proliferieren T-Zellen nicht und synthetisieren nach Bindung an den TCR kein IL-2.

Diese Supressorfunktion wurde zuerst im Mausmodell nachgewiesen: Nacktmäuse, deren Tregs durch Thymektomie oder Komplementwirkung depletiert wurden, entwickelten spontan organspezifische Autoimmunreaktionen (43). Der gleiche Effekt konnte nach Inokulation einer Suspension CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden, die von CD25⁺ T-Zellen befreit wurde (44). CTLA4 exprimierende Tregs von Mäusen unterdrückten zudem CD25-negative CD4⁺T-Zellen von CTLA4-defizienten Mäusen. Es ist anzunehmen, dass die CTLA4-Expression von Tregs von entscheidender Bedeutung für die Unterdrückung der Abstoßung ist: Wie beschrieben, blockiert die höhere Bindungsaffinität von CTLA4 zum B7-Rezeptor der APC die Übermittlung eines costimulatorischen Signals 2 an CD25-negative CD4⁺ T-Zellen.

Ihre immunregulatorische Wirkung entfalten Tregs über direkte Zell-Zell-Kontakte mit potentiellen Zielzellen, gesteuert von autokrinen und parakrinen Mediatoren. Beteiligt an den direkten Zellkontakten sind neben CTLA4 u.a. ICAM-1, TGF- β , GITR und OX40 (CD134) (45). Als Mediatoren der autokrinen Steuerung fungieren IL-10 und TGF- β . Die von Tregs parakrinen exkretierten Substanzen dienen der Umprogrammierung alloreaktiver T-Zellen. Vermittelt wird die immunregulierende Wirkung der Tregs insbesondere über den zuvor beschriebenen indirekten Signalweg (46).

2.1.5. Zytokinexpression bei Abstoßung

Erhalten T-Zellen aktivierende Signale 1 und 2, setzt sich die Signalkaskade in Richtung Abstoßung fort: CD4⁺ T-Zellen (TH1- und TH2) und CD8⁺ T-Zellen (NK-Zellen) synthetisieren spezifische Zytokine, bzw. schütten diese aus. Besondere Bedeutung kommt Interferon Gamma (IFN- γ) und den Interleukinen 2, 4, 5 und 10 (IL-2, 4, 5,10) zu (47).

Die Zytokinkaskade mündet in einer starken inflammatorischen Reaktion, bei der die vermehrte Expression von MHC-Antigenen und Adhäsionsmolekülen eine Attraktion weiterer Effektorzellen auslöst. Das Nierentransplantat geht schließlich zugrunde an der direkten Zytotoxizität CD8⁺ T-Zellen und einem unspezifischen Entzündungsgeschehen, getragen von Makrophagen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten.

Neben dem Zytokinrepertoire sind weitere Unterschiede pathophysiologisch von Bedeutung: TH1- und TH2-Populationen verwenden unterschiedliche Adhäsionsmoleküle zur Migration in entzündetes Gewebe bzw. intrazelluläre Signalwege nach Aktivierung des TCR (48, 49).

2.2. Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern (mAk)

Die Blockierung der Costimulation mit monoklonalen Antikörper (mAk) kann im Tiermodell dauerhafte Allotoleranz induzieren (50). Träger einer so induzierten Toleranz sind CD4⁺ Lymphozyten. Bei adoptivem Transfer dieser Zellen auf einen weiteren Empfänger bleibt die erworbene Toleranz gegenüber dem Transplantatantigen erhalten (51). Aufgrund dieser Eigenschaft spricht man von *dominanter* oder *infektiöser* Toleranz. Über welche Mechanismen diese Toleranz vermittelt wird, ist unklar. Bekannt sind lediglich ihre Ansatzpunkte:

Die Induktion dominanter Toleranz durch mAk gelang erstmals Mitte der achtziger Jahre. Durch Gabe depletierender (=Lymphozyten destruierender) anti-CD4-mAk konnte im Tiermodell eine Abstoßung von Alloimmunglobulinen verhindert werden (52). Unerwünschter Nebeneffekt war die Lymphozytopenie des behandelten Tieres. Später gelang die Synthese nicht-depletierender mAk-Isotypen, durch die es nicht mehr zur Lymphozytopenie kam (53). Mit ihnen gelang es, im Mausmodell Empfängertoleranz gegen u.a. gegenüber Haut-, Herz- und Nierenallotransplantaten zu induzieren (54). Die Funktion dieser ersten mAks, beruhte auf der Blockade des vom T-Zell-Rezeptor transduzierten Signals 1.

Anfang der Neunziger gelang die Synthese von (ebenfalls nicht-depletierendem) CTLA4-Ig als Fusionsprotein von CTLA4 mit dem Fc-Fragment eines Mausimmunoglobulins. Im Rattenmodell konnte durch Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig eine Blockade von Signal 2 (CD28:B7-Bindung) erreicht werden. Es wurden langfristige Überlebenszeiten u.a. in Modellen von Nieren-, Leber- und Inselzelltransplantationen erreicht (55,

56). Inzwischen wurden eine Reihe weiterer mAk isoliert und erfolgreich eingesetzt, die ihre Wirkung ebenfalls über eine Inhibierung der T-Zell-Costimulation (Signal 2) entfalten. Sie wirken an unterschiedlichsten Rezeptoren wie CD45, CD154, LFA1 oder ICAM (57).

2.2.1. Eigenschaften des Fusionsproteins CTLA4-Ig

CTLA4-Ig ist ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von CTLA4 und dem Fc-Fragment eines IgG. Es wurde entwickelt, um die Interaktion von CD28 mit CD80/CD86 therapeutisch blockieren zu können. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigte, dass CTLA-4-Ig in vitro und in vivo T-zellvermittelte Abstoßung ebenso wie humorale Immunreaktionen inhibiert.

Eine kurzfristige Blockierung von CD28 erwies sich zuerst bei Xenotransplantation von Inselzellen und der Herztransplantationen im Maus- und Rattenmodell als überlebensverlängernd (58, 59). Nachgehende Versuche in Nagermodellen zeigten, dass eine Blockierung der CD28:CD80/CD86-vermittelten T-Zell-Costimulation akute Abstoßung verhindert und in manchen Fällen alloantigenspezifische Toleranz beim Empfänger induzieren kann. Die Ergebnisse waren jedoch tierstammabhängig und der Effekt im Primatenmodell deutlich schwächer ausgeprägt als im Nagermodell (31, 60). Anti-CD86/80-Antikörper waren in der Lage, die Abstoßung von Allonierentransplantaten bei Primaten signifikant zu verzögern, ohne dass es einer ergänzenden Behandlung mit Calcineurininhibitoren oder Steroiden bedürfte (61). Eine Kombination beider Komponenten war am effektivsten. Auch in Stadien fortgeschrittener Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis und rheumatoider Arthritis erweist sich die Behandlung mit CTLA4-Ig als wirkungsvoll (62, 63); dies obwohl CD28-vermittelte Costimulation vor allem auf naive T-Zellen wirken soll.

Eine auf ähnlichem Prinzip beruhende Alternativstrategie zielt auf die Blockade von Signal 2 durch CD28-Inhibierung mit monoklonalem Anti-CD28-Ak. Pratschke et al. berichten von der Verhinderung akuter und chronischer Abstoßung bei Nierenallotransplantation im Nagermodell bereits nach kurzzeitiger Behandlung (64). Bei den toleranten Empfängern wurde so die Bildung von Anti-Spender-MHC II-Antikörpern weitgehend unterbunden. Die induzierte Toleranz schien getragen durch eine Subpopulation

nicht-regulatorischer CD86/CD80+T-Zellen, die signifikant erhöhte Konzentrationen vonIDO und induzierbarer NO-Synthase aufwiesen (65).

2.2.2. Klinische Anwendung von CTLA4-Ig

In der klinischen Forschung erfüllten sich die experimentellen Erwartungen anfänglich nicht. Eine Phase-I-Studie mit Empfängern von Nierentransplantaten lieferte zwar Hinweise, dass der Einsatz von mAk gegen CD80 und CD86 (h1F1 und h3D1) Kombinationstherapien mit Cyclosporin, Mycophenolat Mofetil und Steroiden überlegen war (66), die Ergebnisse stellten sich jedoch als statistisch nicht signifikant heraus. Gleichwohl gaben mehrere Gründe Anlass zu Bemühungen um eine Weiterverfolgung dieses Prinzips: Der Ansatz einer Blockade des CD28-Signalweges erschien pathophysiologisch naheliegend. Der CD28-Signalweg ist von kritischer Bedeutung für die T-Zellaktivierung und hochselektiv für CD4+ T-Zellen. Auch mehrten sich die Hinweise, dass eine klinische Wirkung die zeitgleiche Blockade von CD80 und CD86 erfordert. Letzteres schien ein CTLA4-Analogon unabdingbar zu machen.

Aus verschiedenen Molekülvarianten mit alternativen Aminosäuresubstituenten isolierte die Fa. Bristol-Meyer Squibb die von ihr als LEA29Y (*Belatacept*) bezeichnete CTLA4-Ig Variante. LEA29Y besitzt eine erhöhte Bindungsaffinität zu CD86 und in vitro eine ca. 10fach höhere T-Zell-Inhibierungspotenz als CTLA4-Ig (67). LEA29Y zeigte in Primatenstudien Wirksamkeit gegen akute und chronische Abstoßung von Nierentransplantaten; sowohl als Monotherapeutikum als auch in Kombination mit *Basiliximab*, Steroiden und MMF. Auch inhibierte es die Bildung spenderspezifischer Antikörper, die für die Ausbildung chronischer Abstoßung verantwortlich gemacht werden. Sie gelten als Haupthindernis einer –häufig notwendigen– Retransplantation.

In einer Phase II-Studie mit rund 200 Erstempfängern von Allonieren wurde die Wirksamkeit einer LEA29Y-Therapie mit der von Cyclosporin A (CyA) in verschiedenen Kombinationen mit *Basiliximab*, Steroiden und MMF verglichen (68). Bei Biopsie nach sechs Monaten zeigte sich, dass die Erhaltungstherapie mit LEA29Y (i.v.-Infusion alle 4-8 Wochen) gegen akute Abstoßung ebenso wirksam ist, wie CyA (6–7% bei LEA29Y vs. 8% bei CyA). Darüber hinaus zeigten LYA29Y-Patienten nach einem Jahr signifikant bessere Transplantatfunktionen und eine weniger fortgeschrittene *Chronic Allograft Nephropathy* (CAN) als CyA-Patienten. Diese Reduktion der CAN-Schweregrade ist ein

möglicher Hinweis auf ebenfalls verbesserte Langzeitfunktionswerte. Sie stehen bei der noch laufenden Studie bisher aus.

2.3. Der Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden)

Der Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) ist die Summe der Schadenswirkungen auf Transplantat und Empfänger. Pathophysiologisch werden zwei Elemente unterschieden: die entnahmebedingte Transplantatischämie und die nachfolgende Reperfusionsschaden im Empfänger.

2.3.1. Ischämieschaden

Relativer Sauerstoffmangel (Ischämie) führt im Gewebe zur Ansammlung schädigender Stoffwechselprodukte. Infolge der Inhibierung des oxidativen Stoffwechsels kommt es zur Steigerung anaerober Glykolyse und Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase. Durch Ansammlung von Laktat sinkt der zelluläre pH-Wert. Es kommt zur lysosomalen Instabilität und der Aktivierung von Proteasen, Phospholipasen und anderer lytischer Enzyme (69). Gleichzeitig kumulieren Sauerstoffradikale, die unmittelbar zu einer oxidativen Schädigung der Zelle führen und zudem die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) anregen. NO führt seinerseits über mehrere Zwischenschritte zur oxidativen Schädigung intrazellulärer Proteine (70). Die NO-Synthese wird parallel hierzu durch eine hypoxiebedingte Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase gesteigert und aggraviert die beschriebene Schädigung (71). Zusätzlich zur Schädigung durch Stoffwechselprodukte wurde in ischämischen Nierentransplantaten eine Expressionsminderung von Genen nachgewiesen, deren Produkte potentiell zytoprotektiv oder zellregenerativ sind; beispielsweise Hämooxygenase-1 (HO-1) oder Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (72).

2.3.2. Reperfusionsschaden

Bei Reperfusion eines ischämischen Organs kommt es zur Einwirkung einer Reihe von Faktoren, deren gemeinsame Folge als generalisierte Entzündungsreaktion verstanden wird. Die Komponenten lassen sich wiederum pathomechanisch unterscheiden:

2.3.2.1. Apoptotische Komponente bei Reperfusion

Bei Reoxygenierung und Erwärmung kehrt das Organ zum aeroben Stoffwechsel und der Produktion von ATP zurück. Infolge der Ischämieschädigung werden jedoch weiter hohe Konzentrationen schädigender Sauerstoffverbindungen synthetisiert, die unter normoxischen Bedingungen durch Antioxidantien inaktiviert werden würden (73). Hierfür fehlt unmittelbar nach Reperfusion die zelluläre Kapazität. Nach Wiedergewinnung aerober Energie kommt es daher zur reaktiven Apoptose einer Vielzahl von Transplantatzellen (74).

2.3.2.2. Inflammatorische Komponente bei Reperfusion

Nach Reperfusion kommt es zur verstärkten Migration empfängereigener neutrophiler Granulozyten und Monozyten in das postischämische Spenderorgan. Diese Zellen verstärken durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen den vorbestehenden Zellschaden. Die Migration wird stimuliert durch die Ausschwemmung proinflammatorischer Zyto- und Chemokine, die während der Ischämiephase akkumulierten (75). Im Rattenmodell konnte nachgewiesen werden, dass diese Chemokine für den Zeitraum einer Stunde post Ischämie maßgeblich für die Chemotaxis migrierender Neutrozyten sind (76). Die Inaktivierung von IL-8 durch Gabe entsprechender mAk führte im gleichen Modell zu einer signifikanten Verringerung des I/R-Schadens bei Lungentransplantaten (77). Auch bei humanen Nierentransplantaten ist eine erhöhte Expression von IL-8 als chemotaktischem Attraktor für Neutrozyten von nachgewiesener Bedeutung (78).

Die Migration inflammatorischer Zellen wird zusätzlich durch spendereigene Transplantatzellen begünstigt, die ischämiebedingt verstärkt Adhäsionsmolekülen exprimieren; insbesondere ICAM-1 und VCAM-1. Sie vermitteln auf den Endothelzellen des Transplantates die Transmigration von Empfängerneutrozyten (79). Durch Neutrophilenbindung an Adhäsionsmoleküle kommt es zudem zu einer hämodynamischen wirksamen Verstopfung der Kapillaren. Daraus resultiert ein Rückgang der regionalen Perfusion und konsekutiv eine erhöhte Permeabilität des Endothels. Springer und Farhood konnten nachweisen, dass diese Faktoren bei der Pathogenese des I/R-Schaden eine Rolle spielten: Sowohl bei Leber- als auch Nierentransplantation im Rattenmodell fanden sich nach Reperfusion gesteigerte Expressionsraten von ICAM-1 (80, 81). Auch zeigten sie, dass die Inaktivierung von ICAM-1 durch Antikörperbehandlung den Grad der Trans-

plantatschädigung verringert und die postischämische Organfunktion verbessert. In einer weiteren Arbeit zeigten Dragun und Tullius, dass eine Inhibierung der ICAM-1 Expression mittels Antisense Deoxynucleotiden den I/R-Schaden im Rattenmodell der Nierentransplantation verringert und das Transplantatüberleben verlängert (82).

Bisher unzureichend untersucht ist die Rolle empfängereigener Dendritischer Zellen (DC) im Spenderorgan. Aktuelle Untersuchungen lassen annehmen, dass ihnen eine bedeutende Rolle in der frühen Reperfusionphase zukommt: DC scheinen direkt an ischämiegeschädigtes Spenderendothel zu binden (83). Ein Teil tritt anschließend in das Spendergewebe über, phagozytiert Spenderantigen und migriert schließlich zurück in das lymphatische System, um dort das aufgenommene Antigen zu präsentieren. Ein anderer Teil der DC verbleibt nach Endothelbindung –aus bisher unbekanntem Gründen– subendothelial.

2.3.2.3. Häodynamische Komponente

Nach Reperfusion eines ischämiegeschädigten Nierentransplantates lassen sich veränderte Durchblutungsverhältnisse nachweisen. Der renovaskuläre sowie der Widerstand in afferenten Arteriolen sind deutlich erhöht; der transkapillare Druckgradient in Folge deutlich erniedrigt. Im Ergebnis ist die glomeruläre Filtrationsrate signifikant herabgesetzt (84).

Erklärt wird die reduzierte Nierendurchblutung mit einem erhöhten Spiegel des vaso-konstriktorischen Thromboxans (ein Eicosanoid) bei gleichzeitig verringerter Konzentration seines Antagonisten Prostacyclin. Ursache dieses Ungleichgewichts soll eine ischämische Schädigung des für den Eicosanoidstoffwechsels verantwortlichen Gefäßendothels sein (85). Ebenfalls vasokonstriktorisch wirkt sich eine nachgewiesene Konzentrationserhöhung von Endothelin aus. Postischämisch wurden in peritubulären Kapillaren sowohl das Enzym als auch endothelinkodierende mRNA nachgewiesen (86). Eine Blockade des Endothelinrezeptors führte im Rattenmodell zu einer Verringerung des I/R-Schadens und einer Verbesserung der Nierenfunktion (87).

2.4. Fragestellung

Die Frage, inwiefern der antigen-unabhängige Schädigungsmechanismus des Ischämie-Repferfusionsschadens (I/R-Schaden) die tolerogenen Mechanismen der antigen-abhängigen Immunantwort nach Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig beeinflusst, ist bisher nicht geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen eines I/R-Schadens nach Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig auf Transplantatfunktion, Empfängerüberleben und antigen-abhängige Immunantwort untersucht. Dabei wurden zwei Empfängergruppen unterschiedlicher Ischämiezeiten verglichen (~20 min vs. 6 h kalte Ischämie). Gewebeproben der Empfänger wurden in zwei Stufen gewonnen: 100 d nach einer Transplantation mit CTLA4-Ig-Empfängerbehandlung (Stufe I) und 20 d nach einer zweiten Transplantation auf einen neuen Empfänger, dem zuvor Milzleukozyten des toleranten Tieres der ersten Stufe transfiziert wurden (Stufe II). Durch die Toleranzübertragung sollte das Vorliegen einer induzierten Toleranz sichergestellt werden. Auch ermöglichte es eine genaue Eingrenzung möglicher Auswirkungen des I/R-Schadens, da allein die Organe der Stufe I verlängerter Ischämie ausgesetzt wurden. Zielwerte der Stufe I waren die Transplantatfunktion (Proteinurie und Kreatininclearance), Empfängerüberleben und histomorphologische Veränderungen des Transplantates. In Stufe II wurden die Art und Häufigkeit der beteiligten Immunzellen ermittelt. Hierzu wurden in den Gewebeproben die Frequenz CD3⁺ bzw. CD4⁺ T- Zellen, regulatorischer T-Zellen (CD4⁺CD25⁺), sowie der DC (OX62⁺) und der aktivierten DC des Spenders (OX62⁺RT1A^{ab}+CD86⁺) bestimmt. Ferner wurden deren Verteilung auf die Kompartimente Blut, Milz, Lymphknoten und Nierentransplantat ermittelt. Ergänzend wurden die Expressionsniveaus charakteristischer pro- bzw. anti-inflammatorischer Zytokine der Immunzellen (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α) untersucht, um Rückschlüsse auf die Alloreaktivität der T-Zellen bzw. die Aktivierungsgrade der T-Zellen und DC ziehen zu können.

Beantwortet werden sollten die folgenden Fragen: Welchen Einfluss hat eine verlängerte Ischämiezeit des Nierentransplantates nach Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig

1. auf Transplantatfunktion, Empfängerüberleben und histomorphologische Organveränderungen?
2. auf die Frequenz toleranzrelevanter T-Zellen und (aktivierter) Dendritischer Zellen?

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

Im etablierten Rattenmodell wurden T-Zell-Antwort und die Langzeitfunktion des Nierentransplantates nach Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig untersucht. Mit Blick auf die Klinik wurde ferner untersucht, welchen Einfluss eine verlängerte Kaltischämie (6 h) hat.

Davon ausgehend, dass CTLA4-Ig seine Immunmodulation über T-Lymphozyten, (insbesondere CD25+ regulatorische T-Zellen) vermittelt, wurde ein zweistufiges Verfahren gewählt: Transplantatempfängern der Stufe I wurde am dritten postoperativen Tag CTLA4-Ig appliziert. Nach einer Beobachtungszeit von 100 Tagen wurden die Tiere getötet. Aus den entnommenen Milzen wurden Leukozyten isoliert (Zellzahl: 1×10^8) und zum Transfer auf einen zweiten Nierenempfänger (Stufe II) aufbereitet. Mit den Leukozyten sollte die erworbene Toleranz auf den Empfänger der Stufe II übertragen werden. Das Tier wurde zuvor subletal bestrahlt, um eigene Leukozyten zu inaktivieren.

Zur Untersuchung des Ischämieeinflusses sowohl auf die initiale Immunreaktion wie auch auf die transferierte Toleranz wurden für Stufe I zwei Untergruppen gebildet: 5 Minuten vs. 6 Stunden kalte Ischämie. In Stufe II ergab sich die Gruppenbildung anhand des Ursprunges der Spenderleukozyten: Empfänger der Gruppe II/1 erhielten Leukozyten von Empfängern der Gruppe I/2. Empfänger der Gruppe II/2 solche von Tieren der Gruppe I/2.

3.2. Versuchsgruppen

3.2.1.1. Gruppen der Stufe I (Behandlung mit CTLA4-Ig)

Die Empfänger der Stufe I wurden zufällig einer der folgenden zwei Gruppen zugeteilt:

Gruppe I/1: ~20 Minuten kalte Ischämie der Spenderniere (n=18)

Gruppe I/2: 6 Stunden " (n=11).

An Tag 0 wurde Empfänger 1 die Niere eines DA-Spenders transplantiert. Das Organ wurde zuvor ca. 5 Minuten (Gruppe I/1), bzw. 6 Stunden (Gruppe I/2) bei 4°C in UW-Lösung gelagert. Zur technischen Kontrolle erfolgte am zweiten postoperativen Tag eine kontralaterale Nephrektomie. An Tag 3 post OP wurde dem Empfänger eine Einzeldosis von 0,5 mg CTLA4-Ig intraperitoneal injiziert.

Versuchsablauf Stufe I

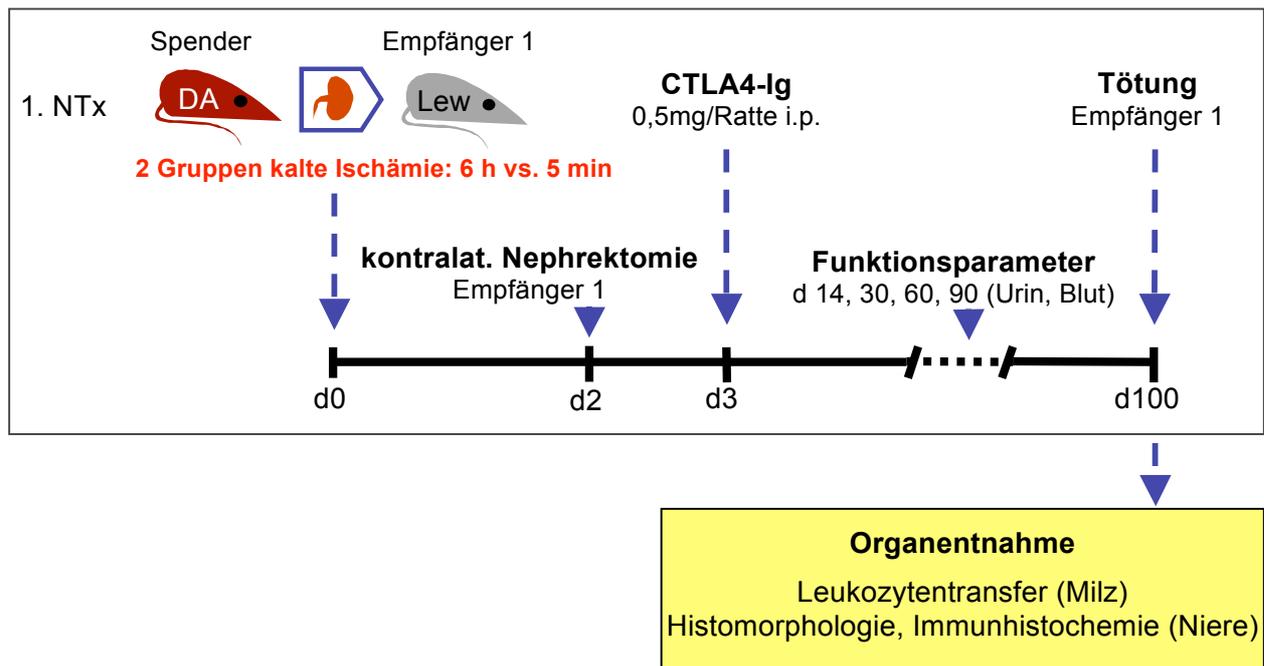


Abbildung 4. Ablauf der Stufe I im Detail. Erläuterungen siehe Text

An den Tagen 14, 30, 60 und 90 nach NTx wurden zur Nierenfunktionsdiagnostik Urin- und Blutproben genommen (Kreatinin-Clearance, Proteinurie). An Tag 100 wurde der Empfänger getötet und Milz (Leukozytenisolation für adoptiven Zelltransfer) und Niere (Morphologie und Immunhistochemie) entnommen.

Eine Übersicht des zeitlichen Ablaufs der Stufe I ist obiger Abbildung 4 zu entnehmen.

3.2.1.2. Gruppen der Stufe II (adoptiver Transfer CD4+ Zellen)

Die Gruppenbildung der Stufe II ergab sich aus der Herkunft der Spenderleukozyten:

Gruppe II/1: Leukozyten Empfängern der Gruppe I/1 (n=3)

Gruppe II/2: Leukozyten Empfänger der Gruppe I/2 (n=7)

Die Tierzahl pro Gruppe war limitiert durch die Anzahl verfügbarer Leukozytenspender (Empfänger Stufe I), die bis zum Zeitpunkt des Zelltransfers überlebten. Die kalte Ischämiezeit wurde bei der NTx in Stufe II nicht variiert und betrug in beiden Gruppen ca. 20 Minuten. Dies entspricht der operativ anfallenden Zeit zwischen Positionierung im Situs und Perfusionsfreigabe nach Fertigstellung der Gefäßanastomosen.

Versuchsablauf Stufe II

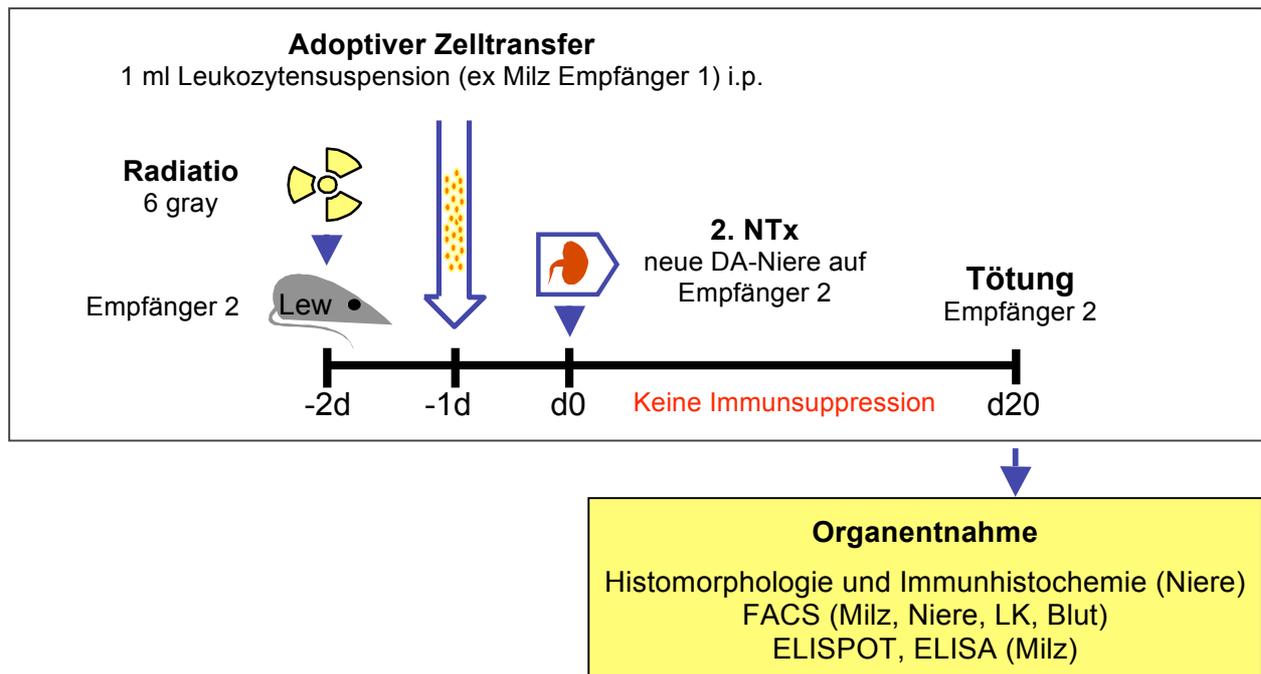


Abbildung 5. Ablauf der Stufe II im Detail. Erläuterung siehe Text

Tiere der Stufe II wurden zur Inaktivierung ihrer Eigenleukozyten 48 Stunden vor NTx subletal bestrahlt (6 Gray). 24 Stunden vor NTx wurden den Empfängern Leukozyten ($\sim 1 \times 10^8$) der Stufe I-Empfänger intraperitoneal injiziert. Am Tag 20 post NTx wurden die Tiere getötet und Niere, Milz und 5-8 aortennahe Lymphknoten entnommen.

Abbildung 5 gibt den zeitlichen Versuchsablauf für diese Gruppen grafisch wieder.

3.2.2. Kontrollgruppen

In der Arbeitsgruppe wurden in den Jahren 2000-2004 nach identischem Verfahren u.a. folgende Kontrollgruppen operiert:

DA→Lewis:	~20 min Ischämie; keine Behandlung	(n=5)
DA→Lewis:	~20 min Ischämie; 0,5 ml NaCl (0,9%); i.p. an d 3	(n=5)
DA→Lewis:	6 h Ischämie ; 0,5 ml NaCl (0,9%); i.p. an d 3	(n=5).

Jeweils am dritten Tag nach NTx erfolgte die kontralaterale Nephrektomie. Sämtliche Tiere verstarben zwischen den postoperativen Tagen 6 und 8. Für die vorliegende Arbeit wurden daher lediglich folgende Kontrollen mitgeführt (Tieralter 3 Monate):

1. DA→Lewis: ~20 min Ischämie 0,5 ml NaCl (0,9%); i.p. an d 3 (n=3)
2. DA→Lewis: 6 h Ischämie 0,5 ml NaCl, (0,9%), i.p. an d 3 (n=3).

Am dritten Tag nach NTx erfolgte bei allen Tieren die kontralaterale Nephrektomie. Die Tiere beider Kontrollgruppen verstarben zwischen dem 7. und 8. Tag nach OP.

3.3. CTLA4-Ig: Eigenschaften und Dosis

Das verwendete CTLA4-Ig ist ein rekombinantes humanes Fusionsprotein mit humaner extrazellulärer Domäne. Es befindet sich in wässriger Lösung mit 25 mM Natriumphosphat und 50 mM Natriumchlorid (pH 7,5). Hersteller ist die Bristol-Myers Squibb Company (Syracuse, NY, USA; Herstellercode: BMS 188667).

Die verwendeten Mengen wurden unentgeltlich zur Verfügung gestellt von Frau PD Dr. Isabella Schmitt-Knosalla (Institut für Medizinische Immunologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin) und Herrn Prof. Anil K Chandraker, M.B.CH.B. (Transplantation Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA, USA).

3.4. Versuchstiere

3.4.1. DA→Lewis Modell der Transplantatabstoßung

Seit Vorstellung durch Fisher und Lee hat sich das Rattenmodell als ein Standardmodell der Nierentransplantatabstoßung etabliert (88, 89). Die hier gewählte Spender-/ Empfängerkombination der Inzuchtstämme Dark Agouti (DA) und Lewis (Lew) wurde erstmals 1979 von Zimmermann et al. beschrieben und ist heute als Modell akuter Abstoßung verbreitet.

Mit genetischen Unterschieden in einem MHC-Gen und verschiedenen nicht-MHC-Genen sind die Stämme ein immunologisch kompletter Mismatch und gelten hinsichtlich der Transplantatabstoßung als *high responder* (90). Genetische Unterschiede bestehen am Locus RT1.A, der für MHC I codiert, und einigen nicht-MHC-Loci (DA: RT1.A^{av1}; LEW: RT1.A^l) (91). Identische Allele bestehen am Locus RT1.B, der für MHC II codiert (beide RT1.B^l) (92).

3.4.2. Tierauswahl, Haltung und Kennzeichnung

Es wurden ausschließlich männliche Ratten der Inzuchtstämme DA und Lewis verwendet (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland). Bei Versuchsbeginn waren die Tiere ca. 12 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 200-230 g.

Je 2 bis 5 Ratten wurden in einem Standardkäfig (BHT 40x20x60cm; Tecniplast, Buguggiate, Italien) gehalten. Sie hatten während der gesamten Zeit unbegrenzten Zugang zu Wasser und artgerechter Spezialnahrung (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland). Unterbringung und Betreuung der Tiere erfolgten in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum (Leitung: PD Dr. med. vet. Christian Große-Siestrup) gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS).

Zur Identifikation wurden den Tieren in Narkose Lochmarkierungen im Ohr angebracht.

3.4.3. Tierschutzrechtliche Genehmigung

Alle Tierversuche im Rahmen dieser Arbeit wurden vom zuständigen Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin am 07.08.2003 unter der Nummer G 0096/03 genehmigt. Die Befristung der Genehmigung bis zum 31.08.2005 wurde mit Schreiben vom 08.09.2005 bis zum 31.08.2006 verlängert.

3.5. Bestrahlung der Empfänger von Stufe II

Die Empfängertiere der Stufe II wurden zwei Tage vor Transplantation in der Klinik für Strahlenheilkunde der Charité Campus Virchow-Klinikum (Leitung Prof. Dr. R. Felix) bestrahlt. Sie wurden im Feld eines Linearbeschleunigers (MEVATRON KD, Siemens) kurzzeitig fixiert und erhielten eine einzelne Ganzkörperdosis von 6 Gray.

3.6. Operation, Applikation und Probenentnahme

3.6.1. Narkose und perioperative Versorgung

Aufgrund besserer Steuerbarkeit und größerer therapeutischer Breite wurde ein Inhalationsverfahren verwendet (93, 94). Die Tiere wurden mit 2%-Vol. Isofluran im Gemisch mit 80% Sauerstoff und 20% Lachgas anästhesiert. Die Einleitung erfolgte in einem

Kunststoffzylinder bei kurzzeitig erhöhter Konzentration von 4%-Vol. Isofluran und einer Applikationsdauer von 2-3 Minuten.

Die Abdomen der Tiere wurden vor den Eingriffen rasiert und die Tiere in Rückenlage unter dem Operationsmikroskop fixiert. Die kontinuierliche Narkoseapplikation und die Absaugung der Expirationsluft erfolgten über eine Gesichtsmaske. Bei Nierenimplantation wurde 15 Minuten nach OP-Beginn die Konzentration auf 1,5%-Vol. Isofluran gesenkt. So wurden für die durchschnittliche Dauer der Operation von 75 Minuten eine ausreichend Tiefe Narkose und rasches postoperatives Erwachen sichergestellt. Nach Abschluss der Eingriffe wurden die Empfänger zum Ausgleich des Wärmeverlustes für 15-20 Minuten unter die Wärmelampe verbracht.

Die postoperative analgetische Versorgung erfolgte entsprechend den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) mit Pentazocin 30 mg/kg KG s.c.

3.6.2. Entnahme und Lagerung der linken Spenderniere

Präoperativ wurden dem Spender 0,05 ml Heparin (in 0,15 ml 0,9%iger NaCl-Lösung in die V. dorsalis profunda penis injiziert. Der Wert einer solchen Koagulationsprophylaxe wird allgemein betont (95).

Das Abdomen des Spenders wurde medial laparotomiert und mit der Präparierschere auf mittlerer Höhe über die volle Breite quer inzidiert. Im freigegebenen Situs wurde das Darmpaket nach links luxiert und fixiert. Die freigelegte linke Niere wurde durch Betropfen mit gekühlter NaCl-Lösung stets feucht gehalten.

Arteria und Vena renalis wurden zwischen Aorta abdominalis bzw. V. cava inferior und dem Nierenhilus durch stumpfe Präparation von Peritoneum und Fett befreit. Um die hiliären Gefäßverzweigungen wurde dabei ein Rest Fett belassen. Mit Mikropinzetten wurden entlang der präparierten Strecke die Adhäsionen zwischen A. und V renalis gelöst. Eventuelle Gefäßab- oder Zugänge wurden ligiert (Seide, Stärke 6/0).

Der Ureter wurde auf Höhe der V. testicularis zu beiden Seiten vom Peritoneum gelöst und bis zum Hilus von Fett befreit. Die Niere wurde vorerst im Fettlager belassen und lediglich zwischen Hilus und ihren Polen von Peritoneum befreit.

Zur Perfusion der Bauchorgane wurde die Pars abdominalis aortae dargestellt und an der Bifurcatio kanüliert (Venenverweilkanüle, Durchm. 1,1 mm). Mit einer Moskitoklem-

me wurden Aorta und V. Cava unmittelbar subdiaphragmal geklemmt. Um einen Abfluss für die zu applizierende Perfusionslösung zu schaffen wurde die V. cava auf Höhe der Bifurcatio durchtrennt. Der so verkleinerte Kreislauf wurde zuerst mit 30 ml 0,9%iger NaCl-Lösung, anschließend mit 20 ml UW-Lösung (von jeweils 4°C gespült. A. und V. renalis wurden dann aortennah, der Ureter auf Höhe der V. testicularis mit einem Scherschlag abgesetzt.

Die Niere wurde nun aus dem umgebenden Fett gelöst und unter Schonung der Kapsel von Peritoneum befreit. Das entnommene Organ wurde bis zur Transplantation bei 4°C UW-Lösung gelagert. Die Dauer dieser kalten Ischämie betrug gruppenabhängig ~20 bzw. 360 Minuten.

3.6.3. Nephrektomie des Empfängers

Das Abdomen des Empfängers wurde medial laparotomiert, das Darmpaket mobilisiert und unter dem rechtem Bauch des M. rectus abdominis im feuchten Gasetuch fixiert. Der linke Muskelbauch wurde analog hierzu nach links retrahiert und gab den Blick auf die linke Niere frei. Nierengefäße und Ureter wurden entsprechend obiger Beschreibung präpariert, die Niere von Peritoneum befreit und aus dem Fettlager gelöst.

A. und V. renalis wurden hilusnah mit Mikrogefäßklemmen geklemmt und mit einem Schlag der Mikroschere durchtrennt. Der Ureter wurde ebenfalls hilusnah durchtrennt, um mit langen Gefäßstümpfen spannungsfreie Anastomosen schaffen zu können. Die Enden der Blutgefäße wurden mit einem Strahl 0,9%iger-NaCl-Lösung von Blut- und Fettresten befreit. Abschließend wurde das Arterienende, allein durch passiven Öffnungsdruck einer Mikropinzettenspitze, vorsichtig geweitet.

3.6.4. Orthotope Implantation der linken Spenderniere

Wie von Fisher und Lee beschrieben, wurde die linke Spenderniere orthotop implantiert und spannungsfrei anastomosiert (88, 96). Mit Positionierung im Situs begann die warme Ischämie. Das Organ wurde von diesem Zeitpunkt an stets vollständig mit einer feuchten Kompresse bedeckt.

Die Gefäßstümpfe der Spenderniere wurden mit physiol. Kochsalzlösung von Resten der UW-Lösung befreit. Innerhalb von 30 Minuten erfolgten Reanastomosierung und die

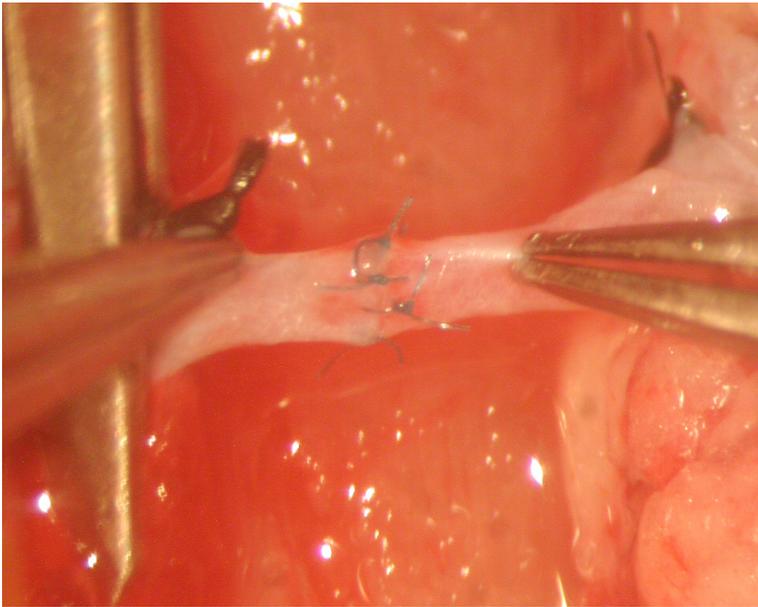


Abbildung 6. Vollständige Anastomose der Arteria renalis. Hinter- und Vorderwand mit insgesamt 6 Einzelknopfnähten verschlossen; links: Mikrogefäßklemme, rechter Bildrand: perirenales Fettgewebe. (Vergr. 16-fach)

an der Gefäßvorderwand angebracht. Dem folgten die übrigen Knoten in gleichmäßigen Abständen erst an der Vorder-, dann an der Rückwand.

Die End-zu-End-Anastomose der V. renalis erfolgte mit fortlaufender Naht gleichen Fa-



Abbildung 7. Fortlaufende Naht der Vena renalis. Hinterwand verschlossen, Vorderwand noch offen; links: Mikrogefäßklemme, rechter Bildrand: Spenderniere; unten erkennbar: Anastomose der A renalis. (Vergr. 25-fach)

Reperfusion. In der Literatur besteht Einigkeit, dass diese Zeitgrenze als kritischer Faktor des technischen OP-Erfolgs zu werten ist (97). Bei Überschreitung wurde das Tier von der Versuchsauswertung ausgeschlossen.

Zur Herstellung der Anastomosen wurde zuerst die Arterie mit 5-7 Einzelknoten eines nicht resorbierbaren Fadens der Stärke 10-0 end-zu-end-anastomosiert. Im Abstand von ca. 160° wurden zwei Knoten

an der Gefäßvorderwand angebracht. Dem folgten die übrigen Knoten in gleichmäßigen Abständen erst an der Vorder-, dann an der Rückwand. Die End-zu-End-Anastomose der V. renalis erfolgte mit fortlaufender Naht gleichen Fa-

dentyps. Der zweite Eckknoten (Ausgangspunkt der fortlaufenden Naht) wurde so angebracht, dass die Venenhinterwand gegenüber der Vorderwand geringgradig kürzer war und kulissenhaft hervortrat. So konnte mit dem Nähen der Hinterwand begonnen werden, ohne dass es eines Umdrehens des Gefäßes bedürfte (vergleiche Abbildung 7): Die Vene wurde dazu nahe dem zweiten Eckknoten durchsto-