

*Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie,
Universitätsklinik Regensburg
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

**Simvastatin als Spendervorbehandlung im Nierentransplantationsmodell
der Ratte**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Manije Sabet-Rashedi

2012

Meinen Eltern und meinem Ehemann.

*Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie,
Universitätsklinik Regensburg
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

**Simvastatin als Spendervorbehandlung im Nierentransplantationsmodell
der Ratte**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Manije Sabet-Rashedi

2012

Dekan: **Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert**

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:
Prof. Edward K. Geissler, PhD
Prof. Dr. med. Bernhard Banas

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2013, 15.00 Uhr

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
ZUSAMMENFASSUNG	10
EINLEITUNG	11
1. NIERENTRANSPLANTATION: INDIKATION UND OUTCOME	11
2. DER ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN (IRS).....	15
2.1. AUSWIRKUNGEN DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADENS	21
2.1.1 Delayed Graft Function (DGF, verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantats).....	21
2.1.2. Chronische Allograftnephropathie bzw. -dysfunktion	22
2.2. STRATEGIEN ZUR PROTEKTION VOR ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHÄDEN	24
2.2.1. Das Hämoxxygenasesystem	26
2.2.2.1. Induktion der HO-1	30
2.2.2.2. Statine- 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Hemmer	31
HYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG.....	36
MATERIAL UND METHODEN.....	38
3.1. VERSUCHSAUFBAU: TRANSPLANTATIONSMODELL DER CHRONISCHEN ABSTOßUNG	38
3.1.1. HERKUNFT DER VERSUCHSTIERE.....	38
3.1.2. TIERKENNZEICHNUNG	39
3.1.3. TIERHALTUNG	39
3.1.4. VERSUCHSGRUPPE.....	39
3.1.2. KONTROLLGRUPPE	40
3.1.7. TESTSUBSTANZEN	41
3.2. OPERATIONS METHODE	41
3.2.1. OPERATIONSVORBEREITUNG UND ANÄSTHESIE.....	41
3.2.2. NIERENTRANSPLANTATION IN DER RATTE	42
3.2.3. SPENDERNEPHREKTOMIE	42
3.2.4. NEPHREKTOMIE DES EMPFÄNGERTIERES	43
3.2.5. END-ZU-END-ANASTOMOSIERUNG DER NIERENARTERIE.....	43
3.2.6. END-ZU-END-ANASTOMOSIERUNG DER NIERENVENE	44

3.2.7. END-ZU-END-ANASTOMOSE DES URETERS.....	44
3.2.8. INSTRUMENTE UND MATERIALIEN	45
3.3. DATENERHEBUNG	46
3.3.1. BEOBSAHTUNGSZEITRAUM.....	46
3.3.2. BEOBSAHTUNGSSENDE	46
3.4. AUFARBEITUNG DER ENTNOMMENEN ORGANE	47
3.4. HOMOGENISIERUNG DES PROBENMATERIALS.....	47
3.5. RNA-PRÄPARATION.....	48
3.6. cDNA-SYNTHESE.....	49
3.7. DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION.....	50
3.7.1. REAL-TIME-PCR (RT-PCR).....	50
3.7.2. ETABLIERUNG EINER PRIMER/SONDEN-KOMBINATION FÜR DIE RT-PCR	53
3.7.3. DURCHFÜHRUNG DER RT-PCR	55
3.8. DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG (FACS).....	56
3.8.1. METHODE	56
3.8.2. DURCHFÜHRUNG	57
3.8.3. ANTIKÖRPERAUSWAHL	58
3.9. IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG	58
3.9.1. DURCHFÜHRUNG	58
3.9.2. ANTIKÖRPERAUSWAHL	59
3.10. UNTERSUCHUNGEN IM STOFFWECHSELKÄFIG	59
3.11. BERECHNUNG DER GLOMERULÄREN FILTRATIONSRATE UND DER PROTEINURIE	60
3.12. STATISTISCHE AUSWERTUNG	60
ERGEBNISSE	61
4.1. GENEXPRESSIONSANALYSE DER HÄMOXYGENASE-1 IN DEN SPENDERORGANEN MILZ, LEBER UND NIERE	61
4.2. PHÄNOTYPISIERUNG GRAFT-INFILTRIERENDER ZELLEN UND ZELLEN DER SEKUNDÄREN LYMPHATISCHEN ORGANE	62
4.3. GENEXPRESSION VON CCR7, CCL19 UND CCL21 IN MILZ UND TRANSPLANTAT IM KURZZEIT- UND LANGZEITVERLAUF	69
4.4. GENEXPRESSION DER IMMUNPROTEASOMUNTEREINHEITEN PSMB8, PSMB9, PSMB10	70

4.5. GENEXPRESSION VON ZYTOKINEN, ADHÄSIONSMOLEKÜLEN, ANTIAPOPTOTISCHEN MARKERN IM KURZ- UND LANGZEITVERLAUF NACH SIMVASTATINVORBEHANDLUNG.....	72
4.6. NIERENFUNKTION IM LANGSZEITVERLAUF	75
4.7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	76
DISKUSSION	78
5.1. SPENDERVORBEHANDLUNG MIT SIMVASTATIN FÜHRT NICHT ZUR INDUKTION DER HO-1 IM SPENDER.....	79
5.2. SIMVASTATIN VORBEHANDLUNG BEEINFLUSST DIE DC-MIGRATION IN SLO, DIE ANTIGENPROZESSIERUNG UND –PRÄSENTATION SOWIE DIE T-ZELL-AKTIVIERUNG	80
6. AUSBLICK: SIMVASTATIN ALS SPENDERVORBEHANDLUNG	85
LITERATURVERZEICHNIS	89
VORTRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN	105
DANKSAGUNG	107

Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktivator Protein
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CAD	Chronische Allograftdysfunktion
CAN	Chronische Allograftnephropathie
CCL	Chemokinligand
CCR, CXCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CO	Kohlenstoffmonoxid
CoPP	Cobalt-Protoporphyrin
DC	Dendritische Zelle
DGF	Delayed graft function, verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantats
DSO	Deutsche Stiftung für Organtransplantation
EDC	Expanded Donor Criteria, erweiterte Spenderkriterien
ET	Eurotransplant
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchfluszytometrie
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HDL	High density lipoprotein, Lipoprotein hoher Dichte
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A
HO	Hämoxygenase
HZV	Herzzeitvolumen
ICAM	Intercellular adhesion molecule, interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low density lipoprotein, Lipoprotein niedriger Dichte
MHC	Major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
NO	Stickstoffmonoxid

NTx	Nierentransplantation
PSMB	Proteasome Subunit, Proteasomenuntereinheit
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction, Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SDC	Standard donor criteria, Standard-Spenderkriterien
SLO	Sekundäre lymphatische Organe
TGF	Transforming growth factor, Transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
UNOS	United Network for Organ Sharing
UW	University of Wisconsin
VSMC	Vascular smooth muscle cells, glatte Gefäßmuskulatur

Zusammenfassung

Zahlreiche Studien demonstrieren, dass der Reperfusionsschaden nach verlängerter kalten Ischämie mit einer verzögerten Transplantatfunktion assoziiert ist und das Transplantatüberleben reduziert. In einem Nierentransplantationsmodell chronischer Rejektion der Ratte demonstrierten wir, dass eine Spendervorbehandlung mit dem Co-enzym-A-Reduktase-Inhibitor (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor), Simvastatin, protektive Eigenschaften vermittelt. F-344 Ratten, welche für 3 Tage mit Simvastatin (10mg/kg/d) vorbehandelt wurden dienten als Nierenspender für LEW-Empfänger. Wir konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Simvastatin zu einer Beeinflussung der Migration antigenpräsentierender Zellen in die Empfängermilz führt. Dies spiegelte sich einerseits durchflusszytometrisch in einer signifikanten Reduktion CD3-CD4+ Monozyten in der Empfängermilz bereits nach 24h ($p=0,0071$) doch auch nach 14tägigem Follow-up ($p=0,01$) wider. Andererseits ließ sich eine signifikante Herunterregulation der m-RNA Expression des sogenannten „homing“-Rezeptors CCR7 ($p=0,0159$) nach 14 Tagen und seiner Liganden CCL19 ($p=0,0357$) und CCL21 ($p=0,0159$) im Langzeitverlauf (6 Monate Follow-up) nachweisen. Des Weiteren kam es zu einer Beeinflussung der Antigenprozessierung und –präsentation sowie der T-Zell-Aktivierung, wie sich anhand der signifikant reduzierten Expression der Immunproteasomenuntereinheiten PSMB8 (nach 14d $p=0,0286$; nach 6 Monaten $p=0,0159$), PSMB9 (nach 24h $p=0,0159$; nach 14d $p=0,0137$; nach 6 Monaten $p=0,0159$) und PSMB10 (nach 24h $p=0,0159$; nach 6 Monaten $p=0,0238$) im Kurz- und Langzeitverlauf, von MHC-Klasse-II (nach 6 Monaten $p=0,0061$) und des T-Zellmarkers CD3 (nach 24h $p=0,0061$) in den Empfängermilzen demonstrieren ließ.

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass Simvastatin die Migration von potentiell antigenpräsentierenden Zellen in sekundär lymphatische Organe (SLO) sowie konsekutiv die Aktivierung der adaptiven Alloimmunantwort reduziert. Aufgrund dieser immunmodulatorischen Wirkungen könnte die Anwendung von Simvastatin einen alternativen Ansatz für die zukünftige Vorbehandlung von Organspendern darstellen.

Einleitung

1. Nierentransplantation: Indikation und Outcome

Die Nierentransplantation (NTx) ist mittlerweile ein etabliertes Therapieverfahren zur Behandlung der irreversiblen, terminalen Niereninsuffizienz. Bei deutlich höherer Lebensqualität, körperlichen Leistungsfähigkeit und sozialer Integration der Patienten ist die Transplantation im Vergleich zum Nierenersatzverfahren zumeist das angestrebte Ziel.

Die häufigste Ursache für Nierenerkrankungen im Endstadium ist die diabetische Nephropathie, gefolgt von der autosomal dominant vererbten polyzystischen Nierenerkrankung, der Nephroangiosklerose bei Hypertonus und verschiedenen primären und sekundären Glomerulopathien. Mit Beginn einer Nierenersatztherapie ist in Deutschland die Voraussetzung zur Listung zur Transplantation erfüllt. Die Wartezeit auf eine Leichenniere beginnt ab dem ersten Tag der Dialyse und beträgt zurzeit ca. 5-6 Jahre [1].

2010 DEUTSCHLAND	
Indikationen für eine Nierentransplantation	
DIE HÄUFIGSTEN ICD-10 HAUPTDIAGNOSEN (BEI NEUANMELDUNG)	
E10.2	Primär insulinabhängiger Diabetes mellitus mit Nierenkomplikation
O61.2	Polyzystische Niere, autosomal-dominant
I12.0	Hypertensive Nierenkrankheit mit Niereninsuffizienz
N03.3	Chron. nephritisches Syndrom – Diffuse mesangioproliferative Glomerulonephr.
N03.9	Chronisches nephritisches Syndrom – nicht näher bezeichnet
N18.0	Terminale Niereninsuffizienz
N04.1	Nephrotisches Syndrom – Fokale und segmentale glomeruläre Läsion
N18.9	Chronische Niereninsuffizienz, nicht näher bezeichnet
N18.8	Sonstige chronische Niereninsuffizienz
E11.2	Nicht primär insulinabhängiger Diabetes mellitus – mit Nierenkomplikationen
	1.956
Bei einem Patienten sind mehrere Diagnosen möglich. Insgesamt: 145 Hauptdiagnosen bei 3.137 Fällen	
Quelle:	Eurotransplant
	DSO 96

Abb. 1: Die 10 häufigsten ICD-10 Hauptdiagnosen als Indikation zur Nierentransplantation im Jahre 2010 in Deutschland. Die häufigste Ursache für terminale Niereninsuffizienz stellt die diabetische Nephropathie dar. (Quelle: DSO, <http://www.dso.de/>)

In den BeNeLux-Staaten, Deutschland, Kroatien, Österreich und Slowenien werden die Nieren nach objektiven Kriterien von der Organisation Eurotransplant (Leiden, Niederlande) vergeben. Im Jahre 2010 wurden in Deutschland 2.272 Nieren von Totspendern transplantiert; in den Ländern, die an der Stiftung Eurotransplant (ET) teilnehmen, waren es 3.421 Nieren. Diese Zahlen stehen in drastischem Kontrast zu der Statistik der Warteliste. Im Jahre 2010 warteten in Deutschland 7.513 Patienten auf eine postmorale Nierenspende, in ET-Ländern insgesamt wurden 10.307 Patienten auf der Warteliste verzeichnet [2].

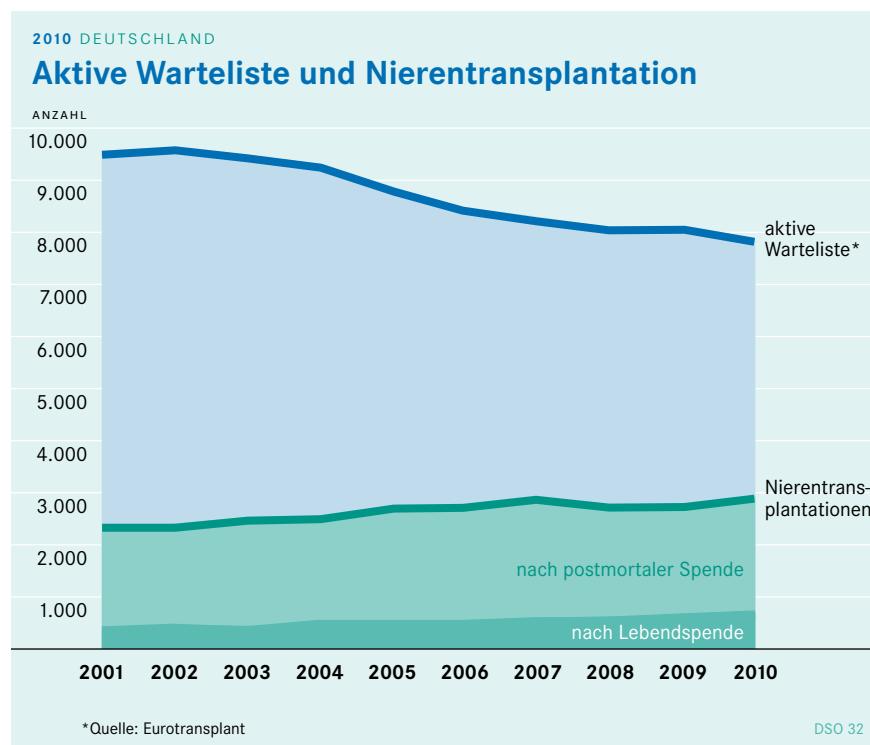


Abb. 2: Aktive Warteliste und Nierentransplantationen in den Jahren 2001-2010. Die Zahl der Patienten/innen in Deutschland, die auf eine neue Niere warten, übersteigt die Zahl der jährlich durchgeführten Transplantationen deutlich.
(Quelle: www.dso.de)

Aufgrund des Missverhältnisses zwischen steigendem Bedarf und mangelndem Organangebot, treten die Vorteile der Lebendspende zunehmend in den Vordergrund. Neben kürzeren Warte- und Dialysezeiten und damit einhergehendem besseren Allgemeinzustand der Patienten, sorgt die Planbarkeit des Eingriffs mit minimierter kalter Ischämiezeit für bessere Kurz- und Langzeittransplantatfunktion und Patientenüberleben [1]. Trotz der deutlichen Vorteile ist die Lebendspende mit 665

Eingriffen, einem Anteil von 22,6% der Nierentransplantationen insgesamt im Jahre 2010 (1) in Deutschland weit weniger verbreitet als beispielsweise in den USA. Nach den Register-Daten des „Organ Procurement and Transplantation Network“ (OPTN) betrug im Jahre 2009 der Anteil der Lebendspenden an den Nierentransplantationen insgesamt 37,9% (6.388 Lebendspenden, 10.442 postmortale Nierenspenden) [3].

Die Funktionsraten der Nierentransplantate liegen derzeit bei etwa 95% Ein-Jahres-Transplantat-Überlebensrate nach Lebendspende und ca. 85% Ein-Jahres-Transplantat-Überlebensrate nach postmortaler Spende (Abb. 3) [1]. Die Diskrepanz zwischen der Transplantatfunktion nach Lebend- und nach postmortaler Nierenspende lässt sich am ehesten durch die verkürzte kalte Ischämiezeit bei Lebendspenden erklären. Dennoch kommt es bei der Mehrzahl der Empfänger in den ersten Jahren posttransplantationem zu einer graduellen aber stetigen Funktionsverschlechterung des Transplantats [4]. Bereits nach fünf Jahren liegt die Transplantat-Überlebensrate nach postmortaler Nierenspende nur noch bei 70,7% verglichen mit 85,3% nach Lebendspende [1]. Der Erhalt der Organfunktion im Langzeitverlauf, der durch multiple Faktoren wie Organqualität, Abstoßungsreaktionen, kalte Ischämiezeit aber auch Immunsuppression beeinflusst wird, stellt demnach einen zentralen Forschungsschwerpunkt der Transplantationsmedizin dar.

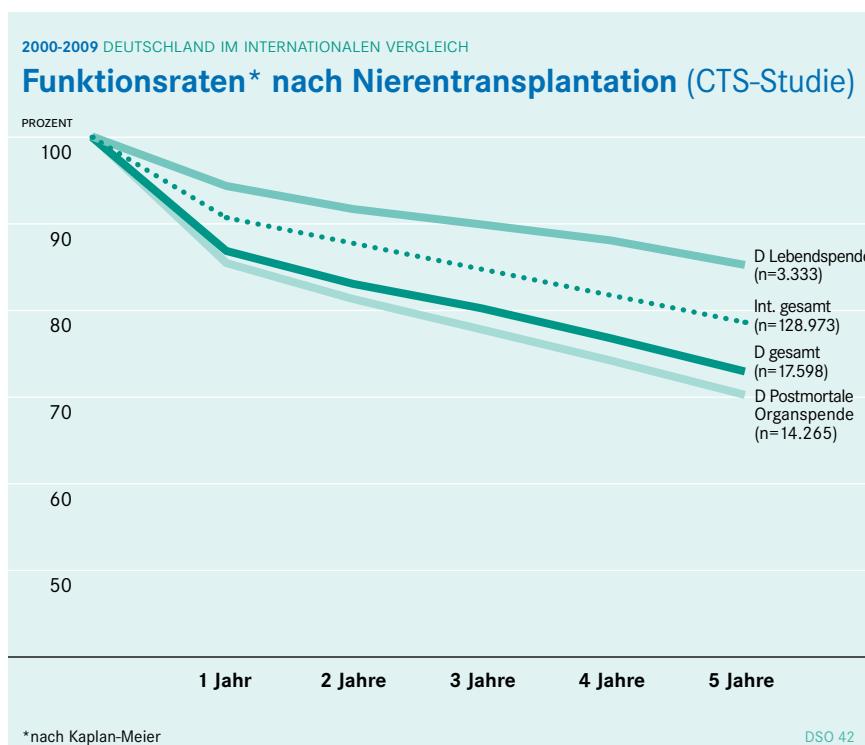


Abb. 3: Funktionsraten nach Nierentransplantation in den Jahren 1998-2009 in Deutschland und im internationalen Vergleich. Nach 5 Jahren liegt die Nierenfunktion nach Lebendspende bei 85,3% wohingegen sie nach postmortaler Organspende nur 70,7% beträgt. (Quelle: www.dso.de)

In Zeiten des Organmangels bei stetig wachsenden Wartelisten und ungenügender Bereitschaft zur Lebendspende wurden alternative Strategien in Betracht gezogen, um den Donorpool zu erweitern [5]. Dies führte in den 1990er Jahren zu dem Konzept der „marginalen Organe“ und 2001 zur Definition der „expanded donor criteria“ durch UNOS [6]. Vor 2001 existierte keine einheitliche Definition für das sogenannte „marginale Organ“. Intuitiv wurden Organe, deren Spendercharakteristika ein schlechtes Outcome vermuten ließen (hohes Spenderalter, verlängerte kalte Ischämie, erhöhte Serumkreatininkonzentrationen vor der Transplantation, kardio- und cerebrovaskuläre Erkrankungen in der Anamnese), als marginal deklariert und von einer Implantation abgesehen [7]. Port et al. [8] identifizierte in einer retrospektiven Studie vier Spenderkriterien, die mit einem signifikant schlechterem postoperativen Ergebnis assoziiert sind: Spender über 60 Jahre und Spender zwischen 50-59 Jahren mit mindestens zwei von drei zusätzlichen Risikofaktoren wurden als marginal bezeichnet. Als drei zusätzliche Risikofaktoren wurden cerebrovaskuläre Insults als Todesursache, arterielle Hypertonie in der Anamnese und Serumkreatininkonzentrationen über 1,5 mg/dl vor der Transplantation identifiziert. Diese Studie wurde 2001 von der American Society of Transplantation in Crystal City als Grundlage zur Definition der „expanded donor criteria“ (EDC) genommen [6]. Die Organknappheit und das zunehmend höhere Alter der Nierenspender erfordert die Verwendung von EDC-Organen. Dennoch berichteten Danovitch et al. in einer retrospektiven Studie von einer Ein- bzw. Fünf-Jahresüberlebensrate von 90,6% bzw. 69% bei Empfängern von EDC-Organen verglichen mit 94,5% und 81,2% für Empfänger von Nicht-EDC-Nieren [9]. Auf der anderen Seite zeigten Ojo et al. [10] 2001 ein signifikant verlängertes Überleben von Empfängern marginaler Organe als von Patienten, die nicht transplantiert sondern weiterhin dialysiert wurden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das aktuelle Ziel der Transplantationsmedizin und -forschung ist, das Langzeit-Outcome sowohl von SDC (Standard donor criteria)- als auch von EDC-Empfängern durch Optimierung der Organkonservierung, Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens aber auch durch Optimierung der Immunsuppression (mit Reduktion von akuten und chronischen Abstoßungsepisoden und gleichzeitig möglichst geringem Nebenwirkungsprofil) zu verbessern.

2. Der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS)

Der Ischämie-Reperfusionsschaden nimmt eine zentrale Stellung im Rahmen der postmortalen Organspende ein. Es handelt sich um einen multifaktoriellen antigenunabhängigen inflammatorischen Prozess, der sowohl für die frühe und späte Transplantatfunktion als auch, der Mehrzahl der aktuellen Studienlage zufolge, für das Langzeitüberleben der Organe entscheidend ist [11, 12]. Zahlreiche Studien und Analysen zeigten bereits, dass der IRS einen bedeutenden Risikofaktor für die verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantats (delayed graft function= DGF) und das Transplantatversagen im Langzeitverlauf darstellt [13, 14]. Bereits in den 1990er Jahren identifizierten Ojo et al. den IRS neben anderen Kofaktoren als einen signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung von DGF und akuten Rejektionsepisoden. Mit der Weiterentwicklung der Immunsuppression ist es gelungen, akute Abstoßungsepisoden weitestgehend einzudämmen; die chronische Allograftnephropathie bzw. –dysfunktion ist nun der limitierende Faktor für das Langzeitüberleben des Transplantats nach Transplantation [15]. Salahudeen et al. zeigten 2004, dass die verlängerte kalte Ischämie (unabhängig von Donor- und Empfängeralter, HLA Mismatch und Immunsuppression) einen signifikanten Prädiktor für das Langzeit-Transplantatversagen darstellt [15]. Trotz zahlreicher Studien und mannigfaltiger Therapieansätze [16-20] ist es bislang nicht gelungen, den Auswirkungen des IRS auf das Langzeit-Outcome nach Organtransplantation entgegen zu wirken. Der IRS setzt sich zusammen aus der Organschädigung während der Phase der initialen warmen Ischämie bei der Organexplantation, der kalten Ischämie während der Perfusion des Organs mit Konservierungslösung sowie des anschließenden Transports und schließlich aus den schädigenden Einflüssen, die bei Reperfusion einsetzen.

Die Dauer der kalten Ischämie, also der hypothermen Konservierung des Transplantats wie auch die operative Dauer der warmen Ischämie bestimmen den Schweregrad des IRS [21]. In seiner Pathophysiologie spielt vor allem die Bildung und Freisetzung freier Sauerstoffradikale eine Schlüsselrolle, doch auch der Verlust an Nitroxid, die Leukozyten-Endothel-Adhäsion und die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren, die zu einer überschießenden Entzündungsreaktion in der Reperfusionsphase führen, sind letztlich für die Störung der Mikrozirkulation sowie Zellnekrosen verantwortlich. Sobald die Ischämie eintritt, setzt eine zeitabhängige Kaskade von metabolischen

Prozessen ein. Mit Beginn der Hypoxie kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer rapiden Depletion der intrazellulären Adenosintriphosphat (ATP)-Speicher. ATP wird unter anderem zu Hypoxanthin degradiert. Die Zellen stellen nun ihren oxidativen Stoffwechsel auf eine insuffiziente anaerobe Glykolyse um [22]. ATP-abhängige Ionentransporter stellen ihre Funktion ein und verursachen einen Kaliumausstrom und Calcium- sowie Natriumeinstrom mit konsekutivem Zusammenbruch des Ruhemembranpotentials. Eine Erhöhung des intrazellulären Natriums führt zu einem gleichzeitigen passiven Wassereinstrom und damit zur Zellschwellung [22]. Aufgrund der Glykolyse wird Glykogen verbraucht, Laktat akkumuliert und der pH gesenkt. Die resultierende Azidose verschlechtert die Viskoelastizität v.a. der Leukozyten. Die Mechanismen während der Ischämiephase sind in Abb. 4 dargestellt (Abb. 4 nach [22]).

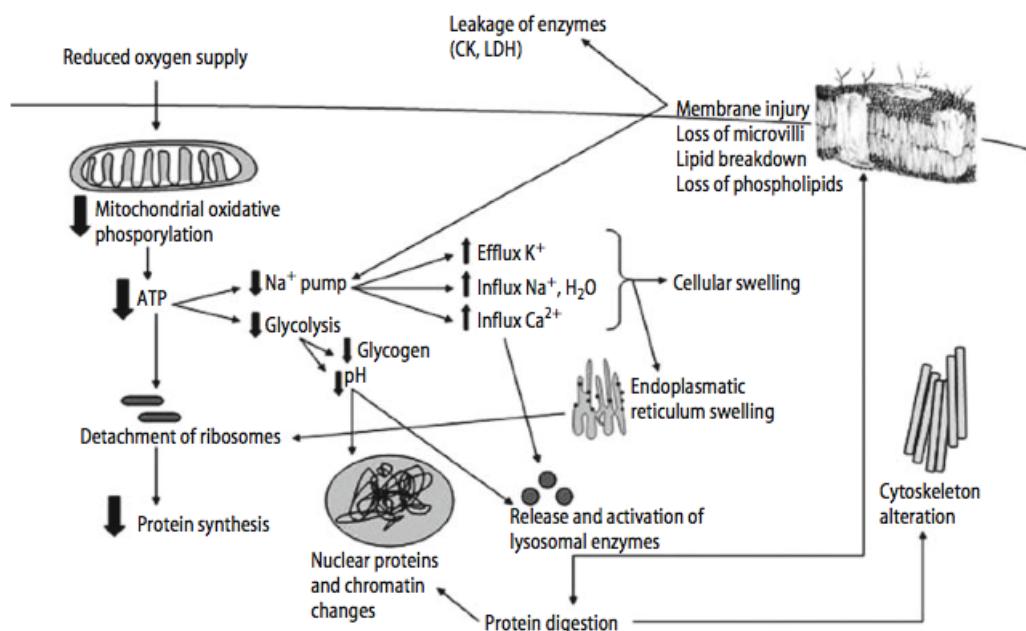


Abb. 4: Darstellung der Mechanismen während der Ischämiephase. Sauerstoffmangel führt zu der Reduktion der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung zur ATP Generierung. Ein insuffizienter anaerober Stoffwechsel führt zur Akkumulation von Laktat mit konsekutiver Azidose. ATP-abhängige Ionentransporter stellen ihre Funktion ein. Es kommt zum Zusammenbruch des Ruhemembranpotentials mit Na⁺- und Ca²⁺- sowie Wassereinstrom und Zell- und Organellenschwellung, die u.a. eine Reduktion der Proteinsynthese nach sich zieht. Azidose und Ca²⁺-Überladung führen zu einer Freisetzung von Proteasen, Phospholipasen, ATPasen, welche die lysosomalen Membranen zerstören und weiterhin saure Hydrolasen freisetzen. Diese greifen das Zytoskelett, den Nukleus und die Plasmamembran an und führen letztendlich zur Zellyse.

Abb. nach Zingarelli et al. *Ischemia-Reperfusion Injury*, 2009

Wird zu diesem Zeitpunkt die Sauerstoffversorgung wiederhergestellt, sind die beschriebenen Prozesse reversibel. Persistiert jedoch die Ischämie, kommt es zu einem irreversiblen Zellschaden [22]. Der intrazelluläre Calciumüberschuss führt zu der Aktivierung von Enzymen wie Proteasen, Phospholipasen und der ATPase. Es kommt zur Lyse der mitochondrialen und lysosomalen Membranen [23]. Der Zelltod erfolgt vornehmlich durch Nekrose, doch die Freisetzung von proapoptotischen Mediatoren durch die Mitochondrien kann zum Teil auch zur Apoptose der Zelle führen [22].

Die Wiederherstellung des Blutflusses durch Reperfusion und die damit verbundene Wiedererlangung der Sauerstoffversorgung ist erforderlich, um Zellschäden zu minimieren. Dennoch löst paradoxerweise auch die Reperfusion eine Kaskade von Prozessen aus, die die Zellen zusätzlich schädigen. Dieser sogenannte Reperfusionsschaden ist vor allem durch oxidativen und nitrosativen Stress, durch endotheliale Dysfunktion, Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [24] sowie durch Komplementaktivierung [25] gekennzeichnet [22]. Die Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien wird durch den IRS schwerwiegend gestört. Durch die Calcium-bedingte Enzymaktivierung während der Ischämiephase wird u.a. die Konversion der Xanthinhydrogenase zur Xanthinoxidase vermittelt. Während der nun folgenden Reperfusion führt das plötzlich wiederhergestellte Sauerstoffangebot in Anwesenheit von hohen Konzentrationen der Xanthinoxidase zur massiven Bildung von Sauerstoffradikalen [26].

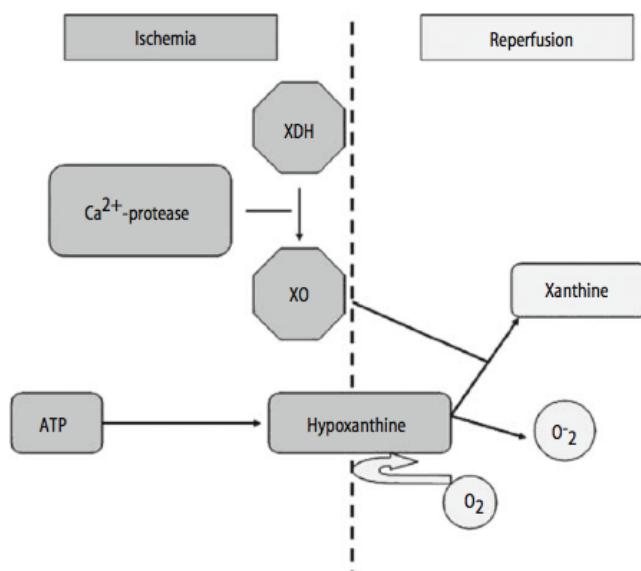


Abb. 5: Generierung von Sauerstoffradikalen (O_2^-) durch die Xanthinoxidase (XO). In der Ischämiephase wird die Xanthinhydrogenase (XDH) zur XO durch calciumabhängige Proteasen konvertiert. Gleichzeitig wird ATP zu Hypoxanthin abgebaut. Im Rahmen der Reperfusionsphase und dem wiederhergestellten Sauerstoffangebot produziert die XO große Mengen an O_2^- .

Abb. nach Zingarelli et al. *Ischemia-Reperfusion Injury*, 2009

Die freien Sauerstoffradikale vermitteln Gewebeschäden einerseits direkt durch Beeinflussung von Enzymen, Proteinen, Lipiden und DNA [27, 28]. Sie führen durch Lipidperoxidation zur Schädigung der Zellmembranen; durch Proteinmodifikation können Enzyme inaktiviert oder Proteine denaturiert werden, doch auch mit Nukleinsäuren können reaktive Sauerstoffspezies interagieren, sie schädigen und eine fehlerhaften Reparatur nach sich ziehen [22]. Auch die NO-Synthasen (eNOS, iNOS) und damit das nitrosative System wird durch den IRS beeinflusst. Die eNOS stellt die konstitutiv exprimierte endotheliale Isoform des Enzyms dar und produziert nur geringe Mengen des Vasodilatators NO.

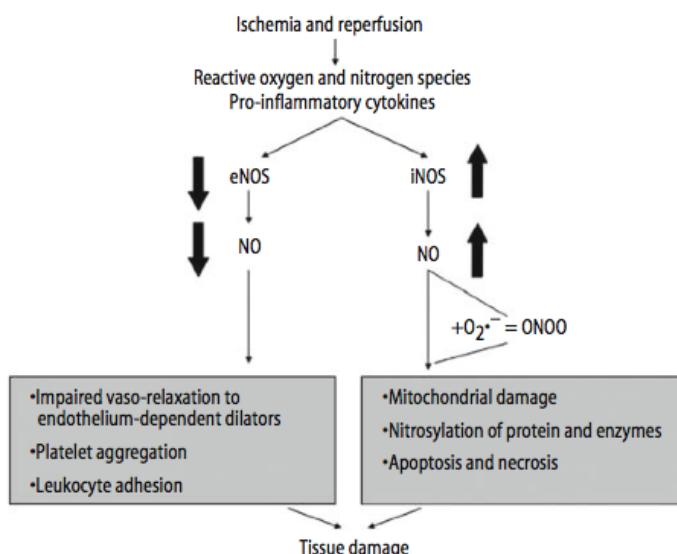


Abb. 6: IRS führt zu einer Reduktion der NO-Synthese. Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies reduzieren die Funktion der konstitutiven endothelialen Nitroxid-Synthase (eNOS). Ein NO-Mangel resultiert in verminderter Vasodilatation und in einer Prädisposition für Thrombozytenaggregation und Leukzytenadhäsion. Im Rahmen eines schweren IRS werden hohe Konzentrationen an NO durch die induzierbare NO-Synthase produziert (iNOS), die durch Bildung von Peroxynitriten (ONOO) zytotoxische Effekte vermitteln. NO und ONOO in hohen Konzentrationen behindern die Atmungskette, induzieren die Nitrosylierung von Proteinen und Enzymen und führen zur Apoptose/Nekrose.

Abb. nach Zingarelli et al. *Ischemia-Reperfusion Injury*, 2009

Die induzierbare Isoform iNOS hingegen kann von allen Zellen im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens exprimiert werden und produziert große Mengen an NO. Der IRS beeinflusst nun dieses System dahingehend, dass die eNOS herunterreguliert und damit das geschädigte Endothel keine Vasodilatation erfährt und

Thrombozyten- und Leukozytenadhäsionen dadurch begünstigt werden. Die iNOS andererseits wird durch die freien Sauerstoffradikale und die damit verbundene Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen heraufreguliert und produziert NO, welches in hohen Konzentrationen mit Superoxiden zu dem toxischen Oxidanten ONOO (Peroxynitrit) reagiert. Peroxynitrit führt ähnlich wie die freien Radikale zu Lipidperoxidation und Interaktionen mit Nukleinsäuren [29-31]. Andererseits vermitteln Sauerstoffradikale auch indirekte Schäden durch Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, welche die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und proapoptotischen Mediatoren zur Folge haben und schließlich eine massive inflammatorische Reaktion induzieren [22]. Die Radikale fördern die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen und führen zur Freisetzung von proinflammatorischen und immunmodulatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF α oder TGF β [32].

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass auch die angeborene Immunität, insbesondere die Toll-like Rezeptoren (TLR) in diesem Kontext beteiligt sind [33, 34]. Letztere vermitteln u.a. die Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen (DCs) und somit einen Shift der Rezeptorexpression in Richtung CCR1, CXCR4 und CCR7 [12], welcher den DCs die Migration vom Ort der Inflammation zu sekundär lymphatischen Organen ermöglicht. Loi et al. zeigten, dass isolierte DCs aus reperfundierte Lebertransplantaten einen reifen Phänotypen mit erhöhter Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/86 (B7) und einer Hochregulation von MHC-Klasse-II und CD1d [35] aufweisen. Die Reifung ermöglicht die Stimulation von naiven T-Zellen und damit die Initiation der adaptiven Immunantwort. Für die Aktivierung der T-Zellen durch DCs sind 2 Signale nötig: das erste Signal ist das Antigen-spezifische Signal durch Bindung des T-Zellrezeptors (TCR) an das Antigenpeptid, das durch das MHC Molekül auf den DCs präsentiert wird. Das zweite Signal wird durch die Bindung der von den DCs exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) an CD28 auf der T-Zelloberfläche vermittelt [36]. Doch nicht nur die Antigenpräsentation wird durch den IRS beeinflusst, auch die Antigenprozessierung unterliegt Ischämiebedingten Veränderungen. So zeigten Kotsch et al. dass es im Rahmen verlängerter kalten Ischämie durch Zytokininduktion (IFN γ , TNF α) zu einer Umstrukturierung der Proteasomenuntereinheiten und zur verstärkten Aktivierung sogenannter Immunproteasomen kommt [37]. Diese multikatalytischen Proteasen dienen der Antigenprozessierung zur Präsentation über MHC-Klasse-I-Komplexe [38]. Das

Proteasom selbst ist fassförmig, besteht aus einer Kerneinheit von 20S und aus 2 zusätzlichen Ringen von 19S. Die Kerneinheit setzt sich zusammen aus 4 Ringen, von denen 2 jeweils aus 7 α- und 7 β-Untereinheiten bestehen [39]. Lymphoides Gewebe und eukaryotische Zellen, die einer Stimulation durch IFNy ausgesetzt wurden, zeigen Unterschiede in der Struktur ihrer Proteasomen im Vergleich zu den konstitutiv exprimierten. Hierbei kommt es zu einer Induktion der β-Untereinheiten „Low-molecular-mass polypeptides 2“ LMP2 (PSMB9), LMP7 (PSMB8) und „Multicatalytic endopeptidase complex subunit“ MECL1 (PSMB10), welche unterschiedliche Substratpräferenzen aufweisen und die konstitutiven katalytischen Untereinheiten x (PSMB5), y (PSMB6), z (PSMB7) ersetzen [39]. Kotsch et al. beobachteten 2007 in einem cDNA Microarray Experiment, dass es im Rahmen des IRS zu einer signifikanten Induktion der Immunproteasomenuntereinheiten im Transplantat kam [37]. Diese Untereinheiten verändern führen zu einer erhöhten Peptiddegradation und erhöhen so das Antigenrepertoire, welches DCs über MHC-Klasse-I-Komplexe CD8+ T-Zellen präsentieren können. Dieser Vorgang wird als „cross-presentation“ bzw. „cross-priming“ bezeichnet und stellt somit einen weiteren wichtigen Pathomechanismus des IRS dar. Ebenfalls eine bedeutende Rolle in der alloantigenabhängigen Immunantwort spielen endotheliale Adhäsionsmoleküle, welche die leukozytäre Diapedese vermitteln. Drei Familien dieser Oberflächenmoleküle wurden identifiziert: Die Selektine, die Immunglobulinsuperfamilie und die Integrine. Ihre Bedeutung in Zusammenhang mit dem IRS wurde bereits vielfach beschrieben [22, 40, 41]. Die Aktivierung des Endothels im Rahmen der Inflammation resultiert in einer erhöhten Expression dieser Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, E- und P-Selektin) und folglich in einer verstärkten Leukozyten-Endothel-Adhäsion mit Infiltration der Leukozyten in das umliegende Gewebe. Diese setzen ihrerseits freie Radikale, Leukotriene und Zytokine frei und initiieren somit eine lokal überschießende Entzündungsreaktion [22]. An die geschädigten Endothelzellen lagern sich nun auch vermehrt Thrombozyten an, die infolge von Mikrothromben die Mikroperfusion nach Reperfusion deutlich beeinträchtigen [32]. Diese postischämischen Mikrovaskulopathien sind außerdem durch endotheliale Ödeme gekennzeichnet, welche durch Lumeneinengung und Obstruktion den lokalen Blutfluss zusätzlich beeinflussen. Dieses sogenannte „no-reflow“ Phänomen [42] kann zu einer verlängerten Ischämiephase, trotz bereits vollzogener Organreperfusion, führen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es sich bei der Pathophysiologie des IRS um ein Zusammenspiel zwischen molekularen Mechanismen, die den initialen Gewebeschaden vermitteln, und der angeborenen und adaptiven Immunantwort handelt, die im Sinne eines circulus vitiosus zur Inflammation und damit zur Exazerbation der Gewebezerstörung führen. Dennoch existieren auch zelluläre und molekuläre Abwehrmechanismen, die bestrebt sind, diesen Entzündungsreaktionen entgegenzuwirken und den Versuch der Anpassung der Zelle an die Hypoxie und das metabolische Ungleichgewicht darstellt. Zu diesen zytoprotektiven Mechanismen gehört u.a. das Hämoxygenasesystem.

2.1. Auswirkungen des Ischämie-Reperfusionsschadens

Zur Therapie von Komplikationen in der Frühphase nach Transplantation ist eine engmaschige Überwachung der Organfunktion unerlässlich. Akute Abstoßungsepisoden sind aufgrund von Fortschritten in der immunologischen Vordiagnostik und der immunsuppressiven Therapien zunehmend in den Hintergrund getreten [43]. Die verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantats (delayed graft function= DGF) und die chronische Allograftnephropathie (CAN) sind Zentrum der aktuellen Forschung [44].

2.1.1 Delayed Graft Function (DGF, verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantats)

Trotz Fortschritte der Therapie akuter Rejektionsepisoden hat die Inzidenz des DGF in den letzten Jahren deutlich zugenommen und reduziert, Studien zufolge, das Langzeit-Outcome des Transplantats um bis zu 40% [45, 46]. Die Ursache des Inzidenzanstiegs liegt vor allem in dem zunehmenden Einsatz von Organen von EDC-Spendern, welche durch eine erhöhte Sensibilität und ein verminderter Regenerationsvermögen gegenüber Schädigungen wie die des Ischämie-Reperfusionsschadens, einer der Hauprisikofaktoren des DGFs, gekennzeichnet sind [47]. Die Definition des DGF ist nicht eindeutig geklärt und variiert in der Literatur [48-51]. In der Mehrheit der Studien gilt jedoch die Dialysepflicht innerhalb der ersten 7 Tagen nach der Transplantation als Kriterium zur Diagnosestellung. Da jedoch die meisten der Transplantatempfänger in den ersten postoperativen Tagen Dialyse erhalten, ohne dass ein Transplantatschaden histologisch gesichert werden kann [52-54], hat auch diese Definition ihre Begrenzungen. Dennoch stellt sie den notwendigen Standard dar, um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Transplantationszentren zu gewährleisten.

Weitere alternative Definitionen sind u.a.: (a) die Anzahl der Tagen, in denen nach der Transplantation eine KreatininClearance von >10ml/min erreicht wird, (b) eine Serumkreatininkonzentration von >3mg/dl am fünften postoperativen Tag und (c) Dialysepflicht innerhalb der ersten 72 postoperativen Stunden [55]. Zu den auslösenden Faktoren des DGF zählen nicht-immunologische Faktoren wie der Ischämie-Reperfusionsschaden, der Hirntod, kardialer Arrest vor Organentnahme, Organe von EDC-Spendern [56] sowie immunologische Faktoren wie eine Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion. Histologisch äußert sich der DGF zumeist als akute Tubulusnekrose mit Dilatation der Tubuli, Verlust des proximalen Brüstensaums und epithelialen Nekrosen und Apoptosen [55]. Die frühen Transplantatschäden, die während eines DGFs auftreten, werden mit einem erhöhten Risiko für chronische Allograftnephropathie bzw. -dysfunktion assoziiert [55]. Allerdings ist seine tatsächliche Auswirkung auf das Langzeit-Transplantatüberleben umstritten [51]. Boom et al. u.a. identifizierten den DGF als Risikofaktor für akute Rejektionsepisoden und suboptimale Transplantatfunktion im ersten postoperativen Jahr, das Langzeit-Outcome zeigte sich hier jedoch nicht beeinträchtigt [57].

2.1.2. Chronische Allograftnephropathie bzw. –dysfunktion

Der Begriff der chronischen Allograftnephropathie (CAN) wurde in den letzten Jahren zunehmend durch den Begriff der chronischen Transplantatdysfunktion (CAD) ersetzt, da CAN als zu unspezifisch und nicht auf die Kausalität hinweisend, erachtet wurde [43]. CAD wird einerseits durch alloantigenabhängige Faktoren, wie die Erkennung von donorspezifischen Antigenen und die konsekutive Aktivierung der empfängerspezifischen Immunantwort, sowie andererseits durch alloantigenunabhängige Faktoren hervorgerufen [44]. Auf dieser Beobachtung beruht die Abwendung von dem Begriff „chronische Rejektion“, welcher die ausschließliche Involvierung immunologischer Faktoren impliziert [58]. In den letzten Jahren ist es gelungen, HLA-Mismatch und akute Abstoßungsepisoden zu limitieren und so die alloantigenabhängigen Faktoren, die zur CAD beitragen, zu reduzieren. Zu den nicht abstoßungsbedingten Ursachen auf der anderen Seite zählen arterielle Hypertonie, medikamentös bedingte Nephrotoxizität, Infektionen und auch der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS). Die CAD ist durch funktionelle Veränderungen im Transplantat und fortschreitende Abnahme der glomerulären Filtrationsrate

gekennzeichnet [43]. Charakteristisch ist ein schleichender Verlauf Wochen bis Jahre nach der Transplantation. Sie manifestiert sich als Transplantat-Glomerulopathie oder Transplantat-Vaskulopathie und führt zu Tubulusatrophie und zur interstitiellen Fibrose [58]. Beruht die chronische Dysfunktion auf nicht-immunologischen Ursachen, so stehen Tubulusatrophie, interstitielle Fibrose, Arterio- und Arteriolosklerose im Vordergrund. Dies konnten Herrero-Fresneda et al. mittels syngenen und allogenen Transplantationsmodellen bestätigen. Tiere des syngenen Modells, die verlängerter kalten Ischämie ausgesetzt wurden, entwickelten im Verlauf eine Niereninsuffizienz mit vorwiegend tubulointerstitiellen Schäden, wohingegen Tiere des allogenen Modells histologisch v.a. Vaskulopathien und Glomerulosklerose aufwiesen [59]. In einer sehr schematischen, dennoch anschaulichen Skizze demonstrieren Fletcher et al. die eben erwähnten histologischen Veränderungen in Abhängigkeit vom auslösenden Faktor (IRS, CNI-Toxizität, Antikörper-vermittelte Rejektion etc.) [16], Abb. 7. Neben der medikamentösen Toxizität identifizierten diverse Studien den IRS als einen der nicht-immunologischen Hauptfaktoren, die eine CAN bzw CAD begünstigen [60-62]. Weiterhin stellt der IRS auch die häufigste Ursache für DGF dar und gilt als Risikofaktor für akute Rejektionsepisoden [63].

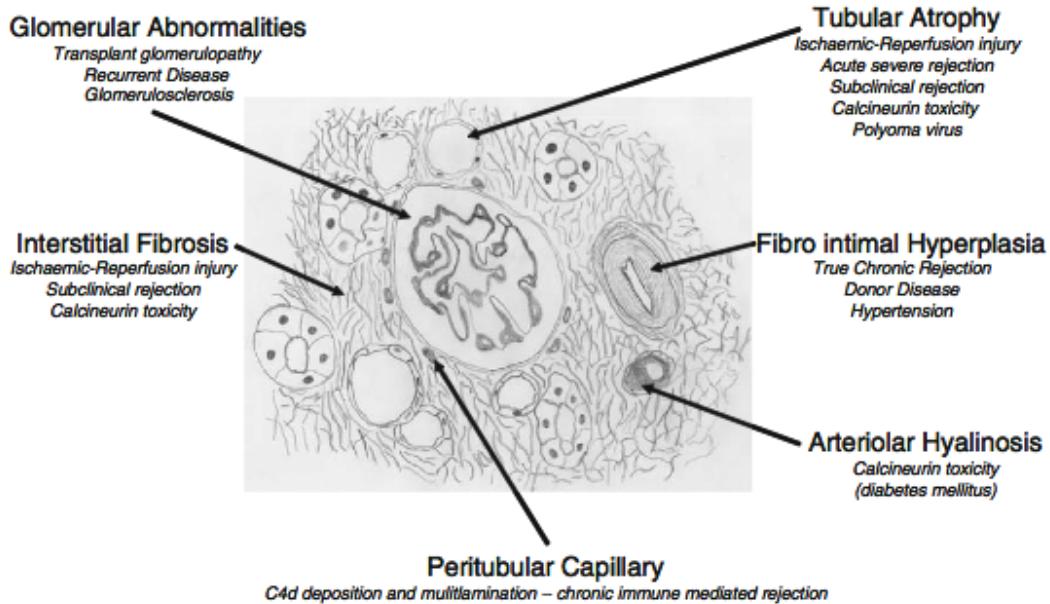


Abb. 7: Schematische Illustration einer Nierenbiopsie mit histopathologischen Charakteristika einer CAN bzw. CAD in Bezug auf ihre auslösenden Faktoren.

Abb. nach Fletcher et al. *Chronic Allograft Nephropathy*, 2009

2.2. Strategien zur Protektion vor Ischämie-Reperfusionsschäden

Der Einfluss des Ischämie-Reperfusionsschadens auf die postoperative Transplantatfunktion und das Transplantatüberleben im Kurzzeit- und Langzeitverlauf ist Schwerpunkt zahlreicher Studien [11, 64]. Abb. 3 demonstriert, dass eine verkürzte Ischämie-Dauer, wie sie bei der Lebendspende der Fall ist, zu besseren postoperativen Funktionsraten führt als nach postmortaler Organspende. In Zeiten des Organmangels und wachsenden Wartelisten werden zunehmend Organe mit erweiterten Spenderkriterien transplantiert. Der IRS führt in diesen Organen zur verzögerten Funktionsaufnahme des Transplantats oder sogar zur sogenannten „primary nonfunction“ [64] und resultiert im Langzeitverlauf in einem reduzierten Transplantatüberleben [65]. Die Limitierung des IRS stellt daher ein zentrales Problem dar, das von zahlreichen Studien thematisiert wird [17, 66-70]. Die bereits etablierten immunsuppressiven Therapien fokussieren zumeist auf die Modulation des Empfängerimmunsystems. Doch auch die Qualität und Immunaktivierung des Transplantats vor der Transplantation wird durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst und stellt selbst eine aktive Komponente des Immungeschehens mit Auswirkung auf das Langzeit-Outcome dar [71, 72]. Die alloantigenabhängigen und –unabhängigen Faktoren führen letztendlich in Zusammenspiel mit der Transplantatqualität zu einer erhöhten Immunogenität des Transplantats. Nachdem bereits 1995 Terasaki et al. beobachteten, dass nicht verwandte Lebenspenden ein besserer Outcome als HLA-matched postmortale Spenden aufwiesen, fiel das Augenmerk der Forschung zunehmend auf die alloantigenunabhängigen Faktoren, insbesondere den IRS [73]. Hinzu kommt, dass der Metabolismus von Leichenspendern einer Reihe von neuronalen, hormonellen und molekularen Veränderungen unterliegt, die zu zellulärem Stress und inflammatorischen Immunreaktionen trotz Antigenabwesenheit führen [74]. Diese initialen Entzündungsreaktionen leiten die Rekrutierung und Wanderung von Spender-DCs in das Transplantat, die Induktion der Expression von MHC Komplexen und kostimulatorischen Signalen sowie die Initiierung der T-Zelldifferenzierung ein, welche posttransplantationem das Risiko für Abstoßungsreaktionen erhöhen [75]. Basierend auf diesen Erkenntnissen bietet die Minimierung dieses initialen zellulären Stresses durch antiinflammatorische und antioxidative Vorbehandlung des Spenders einen interessanten Ansatz, um die antigenunabhängigen und dennoch Immunogenität

erhöhenden Faktoren zu reduzieren. Zur Behandlung des Donors oder des Transplantats wurden bereits diverse Strategien, wie die Pharmakotherapie mit Immunsupressiva [76], Chemotherapie [77], vasoprotektiven Substanzen und monoklonalen Antikörpern [16]), Bestrahlung [78], Zelltransferexperimente (Stammzellen, Splenozyten, DCs, Lymphozyten), ischämische Präkonditionierung und Gentherapien entwickelt, die entweder direkt das Transplantat durch Perfusion oder kalte Konservierung oder den Spender vor der Explantation behandelten. Bei der isolierten Behandlung des Transplantats postexplantationem werden die Membranpermeabilität und die aktiven Transportmechanismen während der Organkonservierung herabgesetzt, so dass der Transport von Substanzen ins intrazelluläre Kompartiment deutlich erschwert ist [79]. Daher bietet eine Vorbehandlung des Spenders den Vorteil, dass der aufrecht erhaltene Metabolismus eine breitere Angriffsfläche darstellt als die Therapie des Transplantats in inaktiven, hypthermen Konservierungslösungen ermöglichen würde. Doch aufgrund der beschriebenen Prozesse, die mit dem Hirntod einsetzen, sollten diese Spendervorbehandlungen sofort mit der Diagnose des Hirntods begonnen werden. Einen viel untersuchten Ansatz stellt die intragraft Depletion von DCs [80] mittels Bestrahlung, zytotoxischer Substanzen und antilymphozytärer Antikörper dar, um die bereits beschriebene Einwanderung dendritischer Zellen in das Transplantat vor Explantation zu verhindern. Der Erfolg dieser Therapieoption in in vivo Experimenten blieb jedoch aus. Die Zytoprotektion durch Anwendung antioxidativer, membranstabilisierender und antiapoptotisch wirkender Substanzen stellt eine weitere Option der Spendervorbehandlung dar [16, 17, 68, 76, 81]. Als Wirkmechanismen spielen hierbei vor allem die Unterbrechung der schädigenden Reaktionen in der Zelle bzw. die Induktion einer pharmakologischen Präkonditionierung eine Rolle. Viel diskutiert und untersucht sind die Wirkungen von Antioxidantien wie Acetylcystein [81], Adenosin, Albumin, Corticosteroide, Cyclosporin, Diclophenac, Ebselen (Selen-haltige Substanzen) [82], FK506, γ -Glutamylcystein-Ethyl-Ester, Glycin, Grün-Tee-Extrakt, Melatonin, PGI2, Superoxiddismutase, Catalase, Trimetazidin und viele andere Substanzen auf den IRS [66]. Diese vornehmlich antioxidativ wirkenden Agentien wurden in verschiedenen Experimenten als Spendervorbehandlung oder aber vor oder während Reperfusion im Empfänger appliziert, um als Radikalfänger den schädigenden Wirkungen der reaktiven Sauerstoffspezies entgegenzuwirken. Die tierexperimentell

nachgewiesenen protektiven Effekte dieser Substanzen ließen sich jedoch nicht in der Klinik etablieren.

Zu den endogenen Mechanismen, die Protektion vor den schädigenden Einflüssen des IRS vermitteln, gehört die induzierbare Hämoxygenase-1 (HO-1), ein Enzym des Hämabbaus, welches Forschungsschwerpunkt zahlreicher Studien darstellt [72, 83, 84] (Kapitel 2.2.1.). In experimentellen Transplantmodellen führte die Überexpression dieses Enzyms zu einer Verbesserung des Transplantatfunktion und des Outcomes nach prolongierter kalten Ischämie [83, 85]. Als Mechanismen wurde u.a. die Hochregulation von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 oder Bag-1 [86], die Reduktion der Intragraft-Einwanderung spenderspezifischer DCs [87] sowie der intragraft Expression von Kostimulationsmolekülen wie CD80/86 und MHC-Klasse-II-Komplexen vorgeschlagen [87]. Weitere antiinflammatorische Wirkungen vermittelt die HO-1 über ihre Abbauprodukte Bilirubin, Biliverdin[88] und CO [89], deren protektive Effekte im Rahmen des IRS in Transplantmodellen bereits gezeigt wurden. Aufgrund der therapeutischen Relevanz der HO-1-Induktion in Bezug auf den IRS beschreibt das nächste Kapitel die Wirkungsmechanismen dieses Enzyms und erörtert die Vor- und Nachteile seiner potentiellen Induktoren.

2.2.1. Das Hämoxygenasesystem

Wie bereits in Kapitel 2 dargestellt, wird das Gewebe während der Reperfusionsphase oxidativem Stress ausgesetzt, der durch die Generierung von frei zirkulierendem Häm zusätzlich potenziert wird [90]. Die Hämoxygenase (HO) ist das Schlüsselenzym, das den Abbau von Häm katalysiert und so den oxidativen Schäden entgegenwirkt [91]. Die Wirkung der Hämoxygenase wurde bereits in zahlreichen Arbeiten untersucht [91-95] und im Kontext der Transplantationsimmunologie konnte durch ihre Induktion eine Verbesserung des Transplantatsüberlebens gezeigt werden [93, 96]. Das Hämoxygenase-System umfasst zwei Isoformen, die in verschiedenen Organen in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Die Hämoxygenase-1 (HO-1 (hsp 32)) gehört der Familie der Hitzeschockproteine an, die durch oxidativen Stress induziert wird und ihre höchste Konzentration in Leber und Milz findet [97]. Die Hämoxygenase-2 wird konstitutiv und ubiquitär exprimiert mit besonders hohen Konzentrationen im Gehirn und Testis [98]. Ursprünglich wurde noch die Existenz einer dritten Isoform, die

Hämoxygenase-3 postuliert [94, 99]. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich hierbei lediglich um ein prozessiertes Pseudogen des HO-2-Transkripts handelte [98]. Als Transkriptionsfaktoren der Hämoxygenasen wurden HMOX1 und HMOX2 identifiziert [98]. Das induzierbare Molekül HO-1 zeigt in diversen Ischämiemodellen potente antioxidative, antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte [96, 98, 100]. Es reagiert höchst sensitiv auf Stressstimuli wie Ischämie und Hypoxie [100], Cobalt-Protoporphyrin (CoPP) [101], UV-Licht [102], Prostaglandine [103], NO [104], Schwermetalle [105], Hydrogenperoxide [106], Lipopolysaccharide [107] und Zytokine [108]. Die Kontrolle der Genexpression erfolgt vorwiegend auf Transkriptionsebene [108]. Die Analyse der Genstruktur identifizierte eine Reihe von Transkriptionsfaktorbindungsstellen an die 5' Region des Promotors. Zu den Transkriptionsfaktoren, die die HO-1 Expression durch Bindung an die E1- und E2-Enhancer-Regionen des HO-1-Gens hochregulieren, gehören E2-related factor-2 (Nrf2), Activator Protein-1 (AP-1) und der Nuklearfaktor KB (NfKB) [109]. In diesen E1- und E2-Regionen befinden sich multiple Stress-Response-Elements, Sequenzen, die infolge von zellulärem Stress, die HO-1 Expression initiieren [110, 111]. Beide Isoformen der Hämoxygenase katalysieren den oxidativen Abbau des Häm-Moleküls in seine Metabolite: Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid (CO). Sie schützen die Zelle vor den schädigenden Einflüssen des Häm-Moleküls, wie z.B. die Lipidperoxidation und die Formation freier Sauerstoffradikale. Das am besten untersuchte Abbauprodukt, CO, ist ein Second-Messenger-Molekül, das unterschiedlichste zelluläre Prozesse moduliert. Es führt ähnlich wie NO zur Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase [112] und beeinflusst somit multiple Prozesse, wie die Inhibition der Thrombozytenaggregation [113], die Reduktion der Leukozyten-Endothelzelladhäsion [114]. Weiterhin wirkt es vasodilatatorisch [115] und antiapoptotisch durch Modulation des Zellzyklus über den p38 mitogen-aktivierten Proteinkinase-Weg [116]. Die verbesserte vaskuläre Situation durch Vasodilatation sowie durch reduzierte Thrombozytenaggregation und damit Minderung von Mikrothrombenbildung trägt möglicherweise auch in der Transplantationschirurgie zu einem verbesserten Transplantatüberleben bei [117]. Darüberhinaus führt das von der HO-1 gebildete CO auch zur Neovaskularisation durch Induktion von VEGF [118] und führte in Studien zu einer verbesserten Wundheilung [119]. Ein weiteres Abbauprodukt des Hämstoffwechsels stellt Biliverdin dar, welches durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert wird. Diese Gallenpigmente stellen einen wichtigen Bestandteil des antioxidativen Systems dar. Die antioxidative Wirkung

des Bilirubins manifestiert sich in einer direkten Neutralisierung von Sauerstoffradikalen und Superoxiden [120, 121]. In diesem Zusammenhang wird Bilirubin wieder zu Bliverdin konvertiert. Sie entfalten somit ihre zytoprotektive Wirkung über die Inhibierung der Lipidperoxidation [122]. Schließlich besitzt Bilirubin auch antiinflammatorische Wirkungen durch Reduktion der Leukozyten-Endothelzelladhäsion sowie der E- und P-Selektin-Expression und Inhibition der Komplementkaskade [123]. Das dritte Abbauprodukt des Hämstoffwechsels stellt freies Eisen dar. Freie Fe²⁺ Ionen reagieren mit zellulären Oxidantien, generieren Hydroxylradikale und wirken somit toxisch [94]. Daher resultiert die HO-1 abhängige Eisenproduktion in einer raschen Expression des Eisenspeicherproteins Ferritin, welches das freie Eisen bindet. Die zytoprotektiven Wirkungen von Eisen werden dementsprechend indirekt über die Ferritinexpression vermittelt [98]. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung einer Fe-ATPase, die zusätzlich den intrazellulären Gehalt an freiem Eisen reduziert [94, 124]. Schließlich wies eine neue Multizenterstudie, die sich mit der Entwicklung der spontanen operationellen Toleranz in lebertransplantierten Patienten beschäftigte, in Microarray-Analysen der Leberbiopsien der Empfängern, welche erfolgreich von der Immunsuppression entwöhnt („Weaning“) werden konnten, erhöhte Expression von Genen des Eisenmetabolismus, u.a. Ferritin und Hepcidin, nach [125]. Sie vermuten daher, dass die Modulation des Eisenmetabolismus zur Toleranzinduktion beitragen kann. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch unklar. Einen weiteren Wirkungsmechanismus der HO-1 beschrieb Lin et al. 2007. Sie zeigten, dass es unter Hypoxie zu einer Abspaltung des C-Terminus der HO-1 kommt und diese in den Nukleus transloziert wird. Hier scheint die HO-1 auf direkte Weise die Expression anderer zytoprotektiv wirkender Gene zu beeinflussen [126].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die HO-1 ihre Effekte nicht nur direkt über ihre Metabolite durch den Abbau des zytotoxischen Häm's sondern auch durch Induktion weiterer potentiell protektiv wirkender Gene vermittelt. Aufgrund der antiapoptotischen und antioxidativen Eigenschaften zählt die induzierbare HO-1 zu den wichtigsten protektiven Proteinen des Organismus, so dass ihre Induktion interessante therapeutische Möglichkeiten bieten könnte.

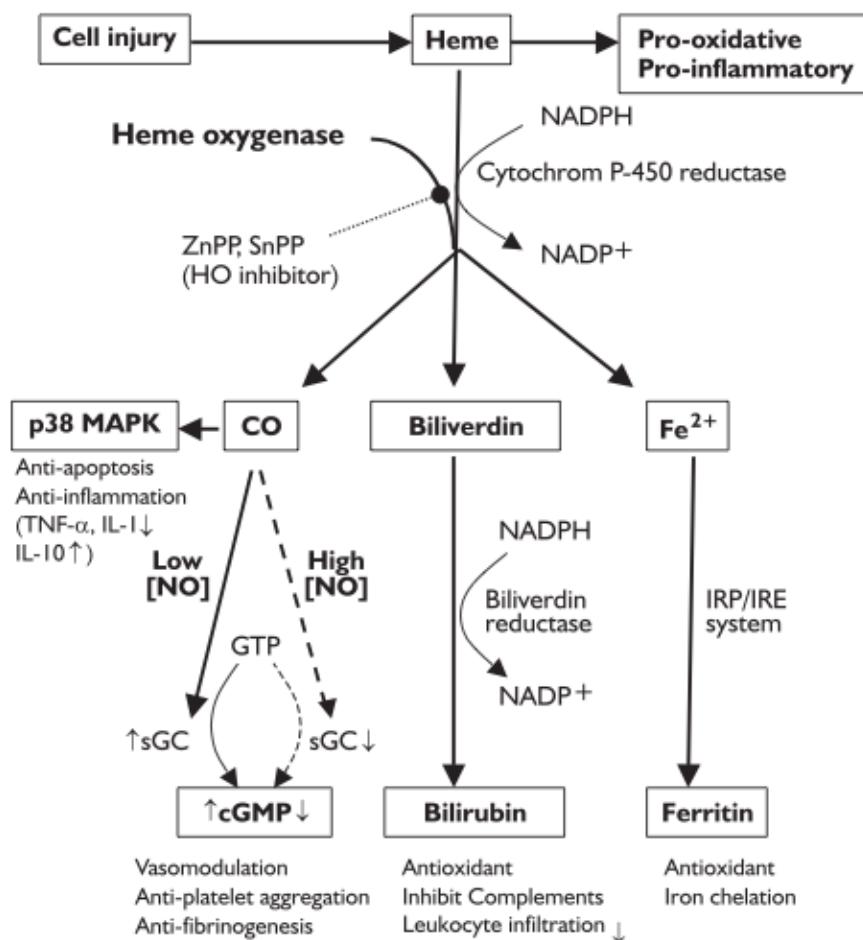


Abb 8. Die Hämoxygenase (HO) führt zum Abbau von Häm zu Biliverdin, CO und Fe²⁺. Biliverdin wird zu Bilirubin reduziert, welche beide reaktive Sauerstoffspezies binden, eine Komplementaktivierung und Leukozyteninfiltration verhindern können. CO besitzt antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte über eine Aktivierung der p38 MAPK, moduliert den Gefäßtonus und vermindert die Thrombozytenaggregation. Freies Eisen wird an Ferritin gebunden, weches seinerseits über antioxidative Effekte verfügt und als Eisen-Chelator Zellschäden reduziert.

Abb. nach Tsuchihashi et al. *Heme Oxygenase System in Ischemia and Reperfusion Injury*, 2004

2.2.2.1. Induktion der HO-1

Die zytoprotektive Wirkung, die eine Überexpression der Hämoxxygenase vermittelt, konnte bereits in verschiedenen IRS-Transplant-Modellen, wie Herz [85, 127], Leber [83, 128-130], Niere [131], Dünndarm [132] und Inselzelltransplantation [133] bestätigt werden. Die meisten der bisher beschriebenen Induktoren der HO-1 zeigen jedoch schwere zelluläre Toxizität *in vivo* [84, 134, 135]. Hierzu gehört das viel untersuchte Kobaltprotoporphyrin (CoPP), ein chemischer HO-1-Induktor, dessen Anwendung im Tiermodell nach Lebertransplantation vor Ischämie-Reperfusions-bedingten Schäden schützt und das Überleben nach Transplantation verlängert. Dies beruht vermutlich auf einer Suppression der Th1 Zytokinproduktion sowie einer verminderter Apoptose [128]. CoPP Applikationen sind jedoch mit ausgeprägten Nebenwirkungen verbunden: Galbraith et al. beschrieben im Tiermodell, dass CoPP zu einer Depletion der hepatischen Zytochrom P450 führt und rapiden Gewichtsverlust zur Folge hat [136]. Des Weiteren werden Hypothyreose [137], Beeinflussung des Kupfermetabolismus [138] und erhöhte GPT und LDH Serumlevel beschrieben. Letztere sind Indikatoren für direkte zytotoxische Effekte und Zellschädigungen. Diese und weitere Nebenwirkungen sind der Grund dafür, dass CoPP trotz HO-1 Induktion in humanen Studien nicht therapeutisch genutzt werden kann. In den letzten Jahren konnten jedoch HO-1 induzierende Substanzen identifiziert werden, die bereits als Arzneimittel Anwendung finden. Beispielsweise demonstrierten Grosser et al. 2003 dass Aspirin zu einem dosisabhängigen Anstieg der HO-1-Proteinlevel und -aktivität in kultivierten Endothelzellen von humanen Umbilikalvenen führt [139]. Eine Vorbehandlung der Zellen mit Aspirin konnte hydrogenperoxid-vermittelte Endothelzellschäden deutlich reduzieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das selten verwendete Probucol, ein Cholesterinsenker, nicht nur die Lipidoxidation inhibiert sondern auch zu einer Induktion der HO-1 führt. Es reduziert Makrophagenakkumulation, stimuliert die Reendothelialisierung und inhibiert VSMC (vascular smooth muscle cells) Proliferation. Allerdings verursacht es auch die Reduktion des HDL sowie eine QT-Verlängerung, so dass es nur selten und mit strenger Indikationsstellung zur Anwendung kommt [140]. Resveratrol, die Hauptkomponente von roten Trauben besitzt kardioprotektive Wirkungen. Studien haben ergeben, dass diese Substanz zu einer pharmakologischen Präkonditionierung des Herzens über einen HO-1 abhängigen NO vermittelten Mechanismus führt. Vorbehandlung mit Resveratrol reduziert deutlich die Infarktgröße

bis zu 24h nach einem stattgehabten Infarkt [141]. Schließlich zeigen auch HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren, die sogenannten Statine, in multiplen Studien induktive Wirkungen auf die HO-1 Expression [142-144]. Es handelt sich hierbei um bereits zugelassene Medikamente im Rahmen der Primär- und Sekundärprävention cerebrovaskulärer Ereignisse mit deutlich geringerem Nebenwirkungsprofil als andere HO-1 Induktoren und zudem mit multiplen pleiotropen und zytoprotektiven Effekten. Da ihre Wirkung auf Ischämie-Reperfusions-bedingte Schäden in der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll, wird diese Substanzklasse im folgenden Unterkapitel gesondert thematisiert.

2.2.2.2. Statine- 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Hemmer

3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktasehemmer (HMG-Co-A-Reduktase-Inhibitoren), auch bekannt als Cholesterinsynthesehemmer (CSE) oder Statine, sind hochpotente lipidsenkende Medikamente zur Therapie der Hypercholesterinämie, die vor allem zur Primär- und Sekundärprävention von kardiovaskulären Ereignissen eingesetzt werden [145]. Sieben Statine (Atorvastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Pravastatin, Simvastatin, Pitavastatin, Rosuvastatin) sind aktuell rezeptierbar. Sie unterscheiden sich vor allem durch ihre pharmakokinetischen Eigenschaften (Lipophilie, Metabolismus, äquipotente Dosis, Interaktionen). Ihre Wirkung beruht in erster Linie auf der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und der damit verbundenen verminderten Produktion von Zwischenprodukten der Cholesterinbiosynthese. Die körpereigene Cholesterinproduktion wird gesenkt und es entsteht ein relativer Cholesterinmangel in den Zellen. Diesem Mangel wirken Statine mit einer vermehrten Expression von LDL-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und einer konsekutiv erhöhten Internalisierung des zirkulierendem low-density Lipoprotein (LDL) aus dem Blut, entgegen. Aus der Blockade der HMG-CoA-Reduktase resultiert demnach eine verminderte De-novo-Cholesterinsynthese bei gleichzeitig erhöhtem LDL-Katabolismus. Umfangreiche Untersuchungen in kardialen Modellen sowie Subgruppenanalysen vorhergehender umfassender Statinstudien deuteten an, dass die positiven Effekte dieser Substanzen auf die Gesamtmortalität auch unabhängig von der Höhe des Gesamtcholesterins vor Therapiebeginn persistieren [146-149]. Zusätzlich zu ihrem Hauptwirkungsmechanismus führt die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase auch zu einer verminderten Synthese von Zwischenprodukten der Cholesterinsynthese,

insbesondere der beiden Isoprenylderivate Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat [150]. Diese dienen unter anderem als Lipidanker für intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle (wie die GTPasen Rho, Ras, Rac) [150]. Ihre Reduktion beeinträchtigt den intrazellulären Transport und die subzelluläre Lokalisation membranassozierter Proteine.

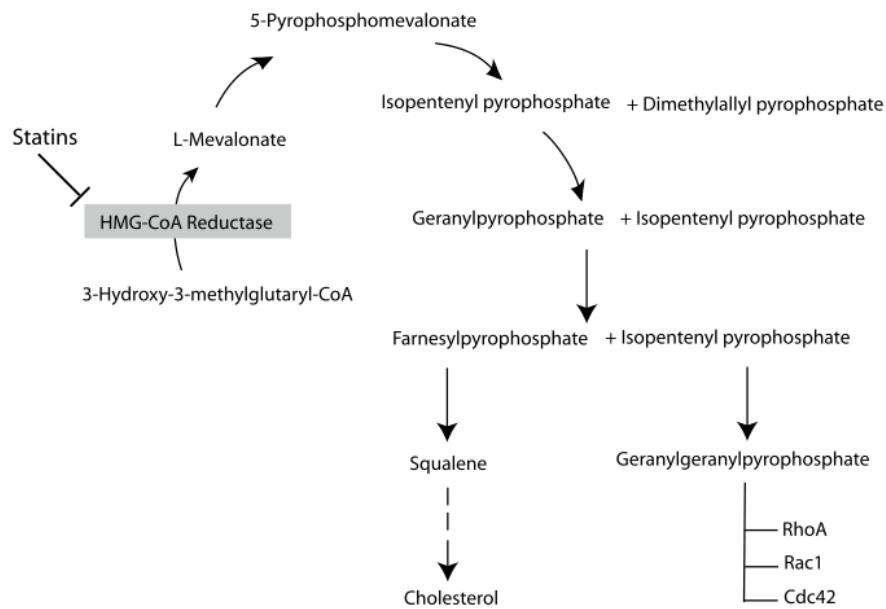


Abb. 9: Wirkungsmechanismus der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer. Statine inhibieren die HMG-CoA-Reduktase und reduzieren intrazelluläre Signalmoleküle wie RhoA, Rac1, Cd42.

Abb. nach Zhou et al. *Pleiotropic Effects of Statins- Basic Research and Clinical Perspectives*, 2010

In den letzten Jahren wurden vermehrt Wirkungen beschrieben, die nicht in direktem Zusammenhang mit der Inhibition der Cholesterinbiosynthese stehen. Diese Cholesterin unabhängigen, sogenannten pleiotropen Effekte wirken sich auf unterschiedlichste Mechanismen und Organsysteme aus [151, 152]. Viel beschrieben sind vor allem die Stickstoffmonoxid vermittelte Minderung endothelialer Dysfunktion und die Induktion von Endothelin-1, plaquestabilisierende Wirkungen, antiproliferative Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen sowie antikoagulatorische Effekte. Diese Eigenschaften, welche in ihren Mechanismen noch nicht ausreichend geklärt sind, vermindern neben den direkten lipidsenkenden Wirkungen der Statine das Risiko der Restenosierung nach vaskulären Ereignissen [153]. In den Fokus des Interesses sind in den letzten Jahren vor allem die antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften dieser Substanzklasse getreten. Beispielsweise belegten Studien, dass nach der Applikation die Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF α) in Makrophagen [69,

154] und Monozyten, sowie die mRNA Konzentration der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Endothelzellen [155] verringert wird. In kardialen Modellen konnte nach Statinapplikation auch eine Reduktion des in der Leber produzierten Entzündungsmarkers CRP (C-reaktives Protein) gezeigt werden, die wiederum mit einer geringeren Anzahl an kardiovaskulären Ereignissen korrelierte [156]. Darüber hinaus wird beschrieben, dass Statine auch die Aktivierung humaner B-Lymphozyten hemmen [157] sowie in transplantierten Organen die Infiltration inflammatorischer Zellen (CD4+, CD8+, CD11b+) verzögern und arteriosklerotische Läsionen unabhängig vom Cholesterinspiegel reduzieren [158]. In einer klinischen Pilotstudie demonstrierten Katznelson et al. [159], dass die Therapie von Nierentransplantierten mit Pravastatin eine reduzierte Inzidenz von chronischen Abstoßungsepisoden nach Transplantation zur Folge hatte. Auch im Tiermodell verbesserte eine Langzeitbehandlung mit Statinen chronische renale Transplantatabstossungen [160]. In darauf folgenden klinischen Studien gelang es jedoch nicht, diesen Benefit der Statintherapie bei nierentransplantierten Patienten zu bestätigen [161, 162]. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz stellt die Tatsache dar, dass die Therapie erst nach klinischer Manifestation des IRS eingeleitet wurde. Mehrere tierexperimentelle Studien unterstützen diese Vermutung, indem sie durch eine Statinapplikation vor Einleitung der warmen Ischämie den Verlauf akuten Nierenversagens mildern konnten [67, 163, 164]. Hierzu gehört die Arbeit von Haylor et al. [69], die die immunmodulatorischen Effekte einer Atorvastatin Behandlung vor einer 45 minütigen warmen Ischämieperiode im renalen Rattenmodell untersuchte. Ischämische Nieren ohne Vorbehandlung waren histologisch durch akute tubuläre Schäden mit tubulärer Dilatation, vermehrtem Zelldebris in tubulären Lumina, frühe nukleäre Pyknose und Dilatation der peritubulären Kapillaren gekennzeichnet. Diese Veränderungen zeigten sich dagegen in den vorbehandelten Tieren deutlich reduziert. In der immunhistochemischen Untersuchung lies sich eine Anreicherung des Ratten Makrophagen- und Monozyten-Marker ED-1 in den tubulären und interstitiellen Regionen nach Ischämie vor allem aber nach Reperfusion nachweisen, welche ebenfalls durch Atorvastatin um 74% verringert wurden. Diese Effekte werden mit einer Reduktion der Caspase-3 erklärt, die die Reifung proinflammatorischer Mediatoren reduziert [165]. Im Hinblick auf die antioxidativen Eigenschaften der Statine wurden diese zunächst im Zusammenhang mit der direkten Statin-bedingten verzögerten Oxidation von LDL [153] und einer damit verbundenen Reduktion der endothelialen Monozytenadhäsion [166] und

Cholesterinaufnahme in Makrophagen gesehen [167]. Untersuchungen von Grosser et al. [142] und Lee et al. [144] lassen jedoch vermuten, dass die Hemmung freier Radikale durch Induktion von HO-1 eine Rolle spielt. Lee et al. demonstrierten in vitro Experimenten, dass eine Simvastatinkonzentration von $10\mu\text{mol/l}$ in humanen und murinen VSMC (vascular smooth muscle cells = glatte Gefäßmuskelzellen) eine Hochregulation der HO-1 bereits nach 3h auslöste, welche bis zu 24h nach Exposition anhielt. Die Induktion war nur in VSMC, nicht jedoch in Endothelzellen nachweisbar. Des Weiteren bestätigten sie die Induzierbarkeit in vivo durch i.p. Injektion von 0,75 bis zu 5mg/kg Simvastatin in C57BL/6J Mäusen. Die erhöhten HO-1 Level waren interessanterweise noch bis zu 24h nach der Injektion messbar. Letztere Beobachtung geht einher mit klinisch kardiologischen Studien, die zeigten, dass eine präinterventionelle Statintherapie vor Koronarangiographie die Mortalität der Patienten deutlich reduziert [168, 169]. Immunhistochemisch ließ sich die HO-1 vornehmlich in der Tunica media der VSMC nachweisen.

Die in vitro Untersuchungen von Grosser et al. [142] lassen vermuten, dass Simvastatin und Lovastatin zu einer Induktion von HO-1 über Hochregulation der Promotoraktivität und der Transkription führt. Bereits niedrige Konzentrationen der Substanz ($1\mu\text{mol/l}$) inhibierten die Formation freier Sauerstoffradikale, die durch Zugabe von NADPH induziert wurde. Die Autoren vermuteten daher, dass die protektiven Effekte von Simvastatin tatsächlich auf die antioxidativen Wirkungen zurückzuführen sind. Um dennoch auszuschließen, dass die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase diese sogenannten pleiotropen Effekte vermittelt, wurde das HMG-CoA-Produkt Mevalonat zu dem Ansatz hinzugefügt, beeinflusste jedoch in keiner Weise die HO-1 Expression. Um den Mechanismus der HO-1 Induktion genauer zu untersuchen, wurde ein Luziferase-Genkonstrukt, das die proximalen 4,0 kb der HO-1 Promotorregion enthielt, generiert. Es konnte gezeigt werden, dass DNA-Sequenzen der HO-1 Region tatsächlich auf Simvastatin ansprechen, dass jedoch weder die HO-1-Stress-Responsive-Elements noch NF κ B oder Nrf2 daran beteiligt sind. Die genauen Mechanismen dieser Induktion auf Transkriptionsebene konnten nicht detailliert geklärt werden. Die aufgeführten Studien deuten daraufhin, dass die protektiven Effekte von Statinen im Allgemeinen und Simvastatin im Besonderen nicht nur im kardialen Modell der Ischämie und Reperfusion nach Infarktereignissen sondern auch zur Reduktion

IRS-bedingter Schäden in der Transplantationsmedizin therapeutisch genutzt werden könnten.

Hypothese und Fragestellung

Die Transplantatimmunogenität wird durch ein Zusammenspiel von alloantigenabhängigen und –unabhängigen Faktoren sowie von der Qualität des Transplantats moduliert. Nachdem die alloantigenabhängigen Faktoren durch HLA-Matching und neue immunsuppressive Therapien weitestgehend kontrolliert werden können, steht nun die Behandlung der alloantigenunabhängigen Faktoren im Zentrum der Forschung. Aufgrund des zunehmenden Einsatzes von Organen mit erweiterten Spenderkriterien, kommt insbesondere dem IRS eine zentrale Rolle zu [72, 170]. Dieser wurde als Risikofaktor für das Kurzzeit- und Langzeit-Outcome von Nierentransplantationen identifiziert und resultiert durch Initiierung von Alloantigen-spezifischen Prozessen in chronischer Allograftnephropathie bzw. –dysfunktion [15].

Neben der Generierung von freien Sauerstoffradikalen und damit direkter Organschädigung, führt eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen zur Rekrutierung und Infiltration von Leukozyten in das Transplantat, welche ihrerseits Sauerstoffradikale bilden, die Transplantatschädigung verstärken und den circulus vitiosus schließen. Weiterhin führen die unspezifischen Immunreaktionen und Zellschädigungen zu einer Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren, die die Reifung von DC und deren Migration in sekundär lymphatische Organe vermittelt, wo die Induktion der direkten Allo-Immunantwort erfolgt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine CoPP induzierte HO-1 Expression die Auswirkungen des IRS mildert und vor Entwicklung der CAN bzw. CAD schützte [93]. Auch vermittelt das Abbauprodukt des Hämstoffwechsels CO die Reduktion von Spender-DCs innerhalb des Grafts, im peripheren Blut sowie in der Milz des Empfängers und führt konsekutiv zu Verminderung der spenderspezifischen T-Zellantwort [37, 89]. Auf der Suche nach nicht-toxischen Induktoren, gelangen Lee et al. und Grosser et al. die Induktion der HO-1 durch Applikation des HMG-CoA-Reduktaseinhibitors, Simvastatin. Ihre Versuche beschränkten sich jedoch auf in vitro Kulturexperimente bzw. auf in vivo HO-1-Induktionsversuche in nicht-transplantierten Wildtypmäusen. Ob dieser Effekt in einem Transplantmodell von Nutzen sein könnte, wurde bislang nicht untersucht. Die beschriebenen antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Wirkungen dieser Substanzklasse andererseits, wurden von Haylor et al. im Sinne einer präoperativen

Statinapplikation zur Reduktion Ischämie-Reperfusions-bedingter Schäden in einem warmen Ischämiemodell bereits genutzt [69]. Dennoch sind die teils reversiblen Vorgänge während warmer Ischämie mit den irreversiblen Schäden, die während kalter prolongierter Ischämie, wie sie bei humaner Leichenspende der Fall sind, stattfinden, nicht uneingeschränkt vergleichbar.

Wir postulieren, dass eine Spendervorbehandlung mit Simvastatin die Transplantatimmunogenität herabsetzt und Ischämie-Reperfusions-bedingte Schäden reduziert. Somit ist das Ziel dieser Studie, den Einfluss dieser Vorbehandlung auf den IRS im Rahmen eines kalten Ischämiemodells der Ratte zu untersuchen und die zugrunde liegenden Mechanismen zu klären. Hierbei gilt es insbesondere die folgenden Unterfragen zu beantworten:

- Führt eine Vorbehandlung mit Simvastatin zu einer Induktion der HO-1 im Spender?
- Beeinflusst die Statinapplikation die Infiltration antigenpräsentierender Zellen in das Transplantat und deren Migration in die sekundär lymphatischen Organe des Empfängers?
- Greift die Statinvorbehandlung in die Prozesse der Antigenprozessierung, -präsentation, Aktivierung der adaptiven Immunantwort und Zytokinproduktion ein?
- Lassen sich die im Kurzzeitverlauf nachgewiesenen Veränderungen im Langzeit-Follow-up reproduzieren?
- Beeinflusst die Statinapplikation die Transplantatfunktion im Langzeitverlauf?

Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau: Transplantationsmodell der chronischen Abstoßung

Für den experimentellen Ansatz wählten wir das etablierte chronische allogene Fischer-Lewis-Nierentransplantationsmodell der Ratte mit einer verlängerten kalten Ischämiezeit von 24 Stunden. Hierbei dienten Fischer-Ratten (F-344) als Spender, die sich nur in Minor-Histokompatibilitäts-Loci von den Empfängertieren, den Lewis-Ratten (LEW), unterscheiden [171]. Alle Versuchstiere wurden nach standardisierter mikrochirurgischer Technik operiert. Die Tiere wurden zufällig den Gruppen der einzelnen Versuche zugeordnet. Chronische Abstoßung ist in diesem Modell durch langsame Verschlechterung der renalen Funktion und progressive Destruktion des Nierenparenchyms gekennzeichnet, die zur endgültigen Abstoßung nach ca. 48 Wochen führt. Es wurde gezeigt, dass Biospien 4 Woche nach der Transplantation milde fokale mononukleäre Zellinfiltrationen und geringe Proliferation der mesangialen Zellen der glomerulären Basalmembran aufweisen. 8-12 Wochen nach Transplantation werden diese milden Veränderungen deutlich verstärkt und gehen mit Proteinurie einher. Nach 28 Wochen offenbart sich eine ausgedehnte interstitielle Fibrose, Zeichen einer chronischen Vaskulopathie und extensive mononukleäre Infiltration [171]. In Kombination mit einer 10 tägigen Ciclosporin-Therapie (1,5mg/kg Körpergewicht), zur Vermeidung etwaiger akuter Abstoßungsepisoden, eignet sich diese Modell besonders zur Untersuchung von allogenunabhängigen Mechanismen wie dem IRS.

Das Projekt wurde im Rahmen eines DFG geförderten Projektes (PR 578/2-5) durchgeführt.

3.1.1. Herkunft der Versuchstiere

Bei den in diesem Modell verwendeten Tieren handelte es sich bei Spender- und Empfängertieren um männliche Ratten definierter Inzuchtstämme. Die Versuchstiere wurden über Charles River Laboratories bezogen. Zum Versuchsbeginn waren die Tiere mindestens 12 Wochen alt und wogen 200-250g. Als Spenderdieren dienten Ratten des Inzuchtstammes F-344, als Empfängertiere, diese des Stammes Lewis (RT11).

3.1.2. Tierkennzeichnung

Es wurden 5 Tiere pro Standardkäfig gehalten. Die Tiere wurden mit entsprechenden Markierungen am Schwanz versehen. Die Käfige wurden zur Identifikation beschriftet. Es handelte sich bei allen Experimenten um genehmigte Tierversuchsvorhaben des Landesamt für Gesundheit und Soziales (Reg 0125/04).

3.1.3. Tierhaltung

Die Ratten erhielten eine Spezialdiät in pelletierter Form (Sniff, Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum. Die Unterbringung erfolgte in der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Charité, Campus Virchow Klinikum unter Standardbedingungen, natürlichem Tag/Nachtrhythmus und einer Raumtemperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.1.4. Versuchsgruppe

In der Versuchsgruppe wurden die Spendertiere, F344-Donoren, 72 Stunden (Tag -4 bis -2) vor orthotoper Nierentransplantation täglich mit einer Dosis von 10mg/kg/d Simvastatin durch intraperitoneale Injektion vorbehandelt (in Kurznarkose). Die Versuchsgruppe bestand aus 15 Tieren. Nach 72 Stunden (Tag -1) erfolgte die Explantation des Transplantats sowie die Entnahme der Milz, Leber und kontralateralen Niere des Spenders, um diese in Vorversuchen nutzen zu können. Das Transplantat wurde nach Explantation einer Ischämiezeit von 24 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ in einer UW-Konservierungslösung ausgesetzt. An Tag 0 wurde schließlich die Transplantation des renalen Transplantats in die Empfängertiere, LEW-Ratten, durchgeführt. Die Empfänger erhielten ab dem Tag der Transplantation bis zum 10. postoperativen Tag (POD) eine tägliche gewichtsadaptierte Ciclosporin-A-Injektion. Zur Organentnahme (Milz und renales Transplantat) der Empfängertiere wurden drei unterschiedliche Zeitpunkte festgelegt:

- nach 24 Stunden (n=5) oder
- nach 14 Tagen (n=5)
- nach 6 Monaten (kontralat. Nephrektomie 10. POD) (n=5)

Bei der Versuchsgruppe mit Organentnahme nach 6 Monaten erfolgte am 10. postoperativen Tag die Nephrektomie der kontralateralen Niere.

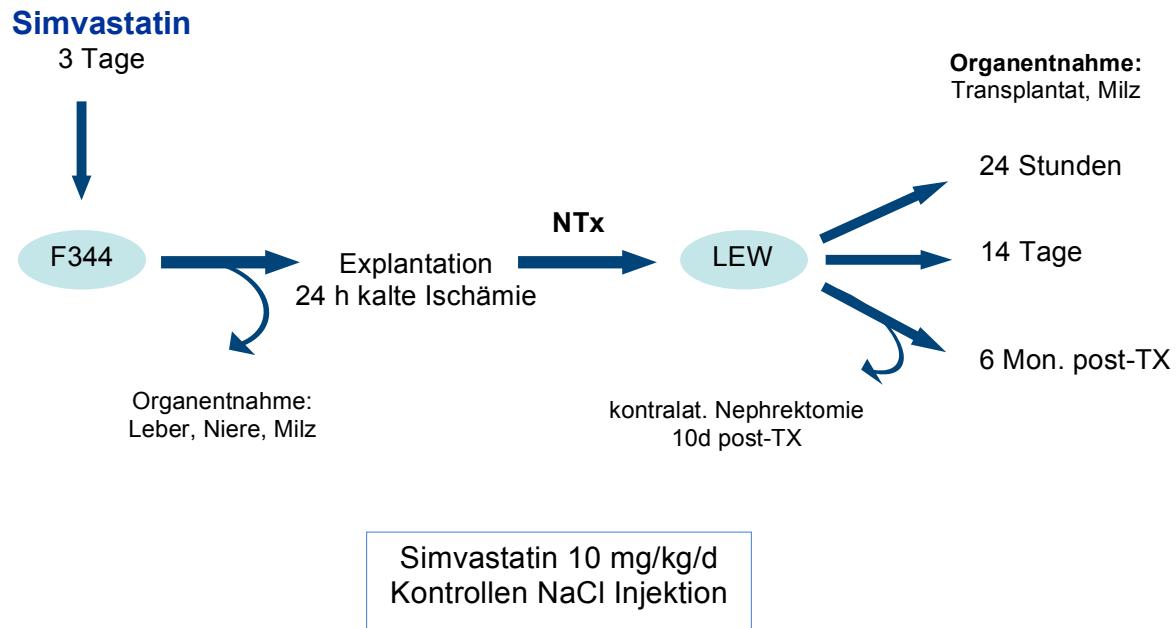


Abb. 10: Versuchsaufbau: 3tägige Vorbehandlung der F344 Donoren mit 10mg/kg/d Simvastatin bzw. mit NaCl in der Kontrollgruppe. Organentnahme der Spenderleber, -niere, -milz zur weiteren Untersuchung und Explantation des Grafts; Transplantation des Grafts erfolgte nach 24stündiger kalter Ischämie am 5. Tag auf LEW Empfänger. Tötung und Organentnahme zu 3 Zeitpunkten:

- 24 Stunden (n=5)
- 14 Tage (n=5) oder
- 6 Monate (n=5, kontralaterale Nephrektomie erfolgte am 10. postoperativen Tag).

3.1.2. Kontrollgruppe

Die Spendertiere der Kontrollgruppe erhielten 72 Stunden (Tag -4 bis -2) vor orthotoper Nierentransplantation eine tägliche intraabdominelle Natriumchlorid-Injektion (in Kurznarkose). Auch die Kontrollgruppe bestand aus 15 Tieren, die ebenfalls zu den gewählten drei Zeitpunkten geerntet und die Organe untersucht wurden.

Das weitere Prozedere entspricht dem der Versuchsgruppe.

3.1.7. Testsubstanzen

Simvastatin wurde von der Firma Merck bezogen und als Trockensubstanz bei 4-8°C gelagert. Die Substanz wurde mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei einem pH von 7,4 und einer Endkonzentration von 10mg/kg Körpergewicht hergestellt und den Spendertieren dreimalig (72h, 48h, 24h) vor der Transplantation intraperitoneal injiziert.

3.2. Operationsmethode

3.2.1. Operationsvorbereitung und Anästhesie

Für die perioperative Narkose der Versuchstiere wurde den Ratten das Inhalationsnarkotikum Isofluoran, ein Gasgemisch aus 20% Sauerstoff und 80% Lachgas, kontinuierlich über eine kombinierte Mund/Nasenmaske zugeführt. Die Kontamination der Umgebungsluft mit Isofluoran wurde durch eine Unterdruck-Absaugvorrichtung verhindert.

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem luftdicht verschlossenen Glaszylinder mit Isofluoranzuleitung und Abzug. In diesem verblieben die Tiere ca. 1-2 Minuten, so dass eine ausreichende Narkosetiefe zur weiteren OP-Vorbereitung garantiert werden konnte. Auf die Narkoseeinleitung folgten die Rasur des gesamten Abdomens und die Fixation der Ratte sowie das Anbringen der Nasen/Mundmaske. Die Fixation erfolgte in Rückenlage auf einem Korkbrett, welches zuvor mit einem Antiseptikum abgesprührt wurde. Die Konzentration des Isofluoran wurde zu Beginn des Eingriffs am Verdampfer auf 2 Vol. % eingestellt, bei der Implantationsoperation jedoch nach der Initialphase auf 1,5 Vol. % reduziert, um bei der Dauer des Eingriffs von ca. 1 Stunde eine Atemdepression infolge Überdosierung zu vermeiden.

Die Versuchstiere wurden auf diese Weise über den gesamten Operationszeitraum in gleichmäßiger Narkose gehalten und erwachten nach Ende des Eingriffs und Entfernung der Narkosemaske zügig.

3.2.2. Nierentransplantation in der Ratte

Fisher und Lee [172] beschrieben erstmals 1965 die bis heute vielfach modulierte Nierentransplantation der Ratte. Es zeigte sich jedoch, dass unterschiedliche Operations- und Anästhesiemethoden keinen Einfluss auf das Outcome, die Funktion des Transplantats oder die Rejektionsepisoden ausüben. Schumacher et al. identifizierten hingegen Gewicht (200-400g) der Ratten und Ischämiezeit als die entscheidenden Einflussfaktoren [173].

3.2.3. Spendernephrektomie

Durch mediane Längslaparatomie wurde das Abdomen in Narkose mit einer Schere von der Blase bis zum Proc. Xiphoideus eröffnet. Mit einer feuchten Komresse wurde das Darmpaket, welches zuvor nach links mobilisiert wurde, bedeckt und das Operationsgebiet, das Retroperitoneum, durch Anbringen von vier Wundhaken optimal eingestellt. Nun wurde mit der stumpfen Präparation des linken Nierenhilus begonnen und im Anschluss die Vena und Arteria renalis vorsichtig, unter Vermeidung zu starken Zugs (Venenperforation, Arterienkonstriktion) mit Mikropinzetten separiert und von Adventitia und Fettgewebe befreit. Variable Gefäßabgänge der A./V. Suprarenalis wurden mit 6/0 Ligaturen unterbunden und durchtrennt. Dann erfolgte die atraumatische Präparation der Niere aus ihrem perirenalen Fettgewebe mittels der Mikroschere. Im Fettgewebe wurde nun der Ureter mit Wattestäbchen aufgesucht und samt seiner Gefäße weit distal abgesetzt. Um die Niere später perfundieren zu können, wurde die Aorta abdominalis knapp proximal des Truncus coeliacus zum Anlegen eines Gefäßclips präpariert und eine Ligatur proximal der Nierenvene locker vorgelegt. Eine 10ml Spritze mit kaltem 0,9% NaCl sowie eine weitere 10ml Spritze mit kalter UW-Lösung (University of Wisconsin) wurden bereit gelegt. Die nachfolgende Perfusion und Entnahme mussten zur Limitierung der warmen Ischämiezeit und Vermeidung zu großer Irritation des Transplantats möglichst schnell aber vorsichtig erfolgen. Die distale Aorta abdominalis wurde nun mit einer 0,9 x 25mm Venenverweilkanüle punktiert, der Gefäßclip oberhalb des Abgangs des Truncus coeliacus angebracht und die vorgelegte

Venenligatur geknüpft. Nun wurde die Vena renalis ligaturnah durchtrennt, um so einen Abfluss zu schaffen.

Im Anschluss daran wurde die Niere über die Verweilkanüle mit 10ml 0,9% NaCl, gefolgt von 10ml UW-Lösung perfundiert, woraufhin sie sich sofort entfärbte. Nachdem die Nierenarterie mit einem Scherenschlag durchtrennt wurde, konnte das Transplantat aus dem Situs entfernt werden. Die Lagerung erfolgte in UW-Lösung für 24 Stunden (kalte Ischämie) bei +4°C. Zur Perfusion der Leber und kontralateralen Niere wurde weiterhin mit 20ml 0,9% NaCl gespült bis eine völlige Entfärbung der Organe eintrat. Das Spendertier wurde in Narkose durch Einschneiden des Diaphragmas getötet. Nach der Tötung wurden zügig die Milz, die kontralaterale Niere sowie die Leber entnommen, die Organe mit einem sterilen Skalpell zerteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Spendertier wurde vorschriftsmäßig entsorgt und die Organe bei -80°C gelagert.

3.2.4. Nephrektomie des Empfängertieres

Die ersten Schritte entsprechen hierbei weitestgehend der Spendernephrektomie. Nachdem die linke Niere und der Nierenhilus aus dem Retroperitoneum freigelegt wurden, erfolgte die Präparation der Nierengefäße in ihrem Verlauf. Proximal wurde jeweils ein Gefäßclip gesetzt und die Gefäße durchtrennt.

Mittels Mirkopinzette wurden die Gefäßstümpfe nun vorsichtig aufgedehnt und sorgfältig mit NaCl 0,9% gespült. Schließlich wurde der Ureter stumpf freigelegt und nierennah durchtrennt sowie die Niere von perirenalem Fettgebe befreit und aus dem Situs entfernt.

3.2.5. End-zu-End-Anastomosierung der Nierenarterie

Die Spenderniere wurde so in das linke Nierenlager gelegt, dass die Gefäßstümpfe bei Anastomosierung möglichst dicht beieinander lagen und jegliche Zugspannung auf das Gewebe vermieden werden konnte. Für die Gefäß- und Ureternähte wurden 10/0 Prolenefäden der Firma Ethicon, verwendet. Die Anastomose der Arterie bestand aus 8-10 Einzelknopfnähten. Zuerst wurden zwei Haltefäden an den gegenüberliegenden Eckseiten des Gefäßes angebracht und an der Vorderwand drei bis vier

Einzelknopfnähte gesetzt. Dann wurde die Arterie an der Haltefäden um 180° gedreht, um die Hinterwand ebenfalls mit drei bis vier Nähten versehen zu können. Hierbei musste auf gleiche Abstände zwischen den einzelnen Nähten geachtet werden, um spätere Leckagen zu vermeiden. Nachdem die Arterie wieder in ihre Ausgangslage gedreht worden ist, konnten nun die Haltefäden gekürzt werden.

3.2.6. End-zu-End-Anastomosierung der Nierenvene

Zur Darstellung von Vorder- und Rückwand wurden auch hier zwei Haltefäden an den gegenüberliegenden Eckpunkten vorgelegt und das Gefäß mit NaCl 0,9% angefeuchtet. Im nächsten Schritt wurde mit einem der Haltefäden die Venenhinterwand transluminal fortlaufend genäht und am kaudalen Ende locker geknüpft. In gleicher Weise erfolgte der Verschluss der Vorderwand, hier von kaudal nach kranial. Um eine Stenose zu vermeiden, wurde vor Setzen des Endknotens das Lumen mit einer Mikropinzette nochmals aufgedehnt. Die Prüfung der Anastomosen erfolgte zuerst durch Entfernung des venösen und im Anschluss des arteriellen Gefäßclips. Eine Leckage hätte so bei vorsichtiger Freigabe der Durchblutung nochmals übernäht werden können. Nach Entfernung aller Gefäßclips wurden kleinere Blutungen durch leichte Kompression mit Wattetupfern oder durch Einlegen kleiner Tabotampstreifen gestillt.

3.2.7. End-zu-End-Anastomose des Ureters

Nachdem die Ureterstümpfe mit 0,9% NaCl angefeuchtet wurden, wurden in gleicher Weise wie bei den Gefäßnähten Haltefäden an den Eckpunkten angelegt und durch eine einzelne mittige Naht jeweils an der Vorder- und Hinterwand ergänzt. Um Verletzungen des Ureters zu vermeiden, wurde dieser bei der Anastomosierung nicht direkt gegriffen sondern mittels Mikropinzette nur am periureteralem Fettgewebe gefasst. Weiterhin wurde während der gesamten Operationszeit der Darm stets mit einer feuchten Komresse bedeckt gehalten und die Niere ständig angefeuchtet (0,9% NaCl). Der Verschluss des Abdomens erfolgte zweischichtig (Muskulatur, Haut) fortlaufend mit Vicryl 4/0. Während des Erwachens wurden die Tiere für 30 Minuten unter eine Rotlichtlampe gewärmt und in den Käfig zurückgelegt.

3.2.8. Instrumente und Materialien

Für die Nierentransplantation wurden folgende Instrumente und Materialien benutzt:

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Operationsmikroskop M690 (Fa. Leica)

Korkplatte 35cm X 35cm

sterile OP-Abdecktücher

Multikompressen 10cm X 10cm

Wattetupfer

Kanülen (verschiedene Größen)

Spritzen (1ml, 5ml, 10ml, 20ml)

Venenverweilkanüle 0,9 x 25mm (Fa. Venflon)

Urinbecher 50ml

sterile NaCl 0,9% Lösung (Fa. Braun)

Tabotamp 5 x 7.5cm (Fa.Ethicon)

Chirurgisches Instrumentarium

Präparierschere BC 263 (Fa. Aesculap)

Splitterpinzette BD 520 (Fa. Aesculap)

Nadelhalter 8709N (Fa. Codman)

Bauchhaken (Eigenbau)

Mikrochirurgisches Instrumentarium

Pinzetten 30-6715 (Fa.Codman)

Gebogene Federschere 2401/894 Q (Fa. Weck)

Gefäßklemmen 20-1251 (Fa.Codman)

Nadelhalter 80-2003 (Fa.Codman)

Nahtmaterial

Vicryl 4/0 (Fa. Ethicon)

Prolene 10/0, BV-4, EH 7596 (Fa.Ethicon)

6/0 Seide "E" geflochten (Fa.Resoba)

Konservierungslösung

ViaSpan Belzer UW- (University of Wisconsin) Lösung a 1000ml, Du Pont Pharma

Medikamente

Isofluran 250ml (Fa. Curamed)

Simvastatin (Fa. Merck)

Cyclosporin A (Fa. Novartis)

3.3. Datenerhebung

3.3.1. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum betrug 24 Stunden bzw. 14 Tage und im Langzeitmodell 6 Monate. Bei Tieren, die innerhalb dieses Zeitraums verstarben, wurde eine Autopsie durchgeführt, um etwaige andere Todesursachen (Infektionen, Blutungen) auszuschließen. In diesen Fällen wurden die Tiere in die Versuchsauswertung nicht mit einbezogen.

3.3.2. Beobachtungsende

Am regulären Ende des Beobachtungszeitraumes wurde das Tier in Narkose gelegt und das Abdomen durch Längslaparatomie eröffnet. Analog zur Nierentransplantation wurde nun das Retroperitoneum freigelegt. Nachdem die Aorta mit einer Venenverweilkanüle (0,9 x 25mm) punktiert wurde, konnte das Transplantat über diesen Zugang mit 20ml kalter 0,9% NaCl-Perfusionsflüssigkeit gespült werden. Um einen Abfluss zu schaffen, wurde zuvor bereits proximal des Nierenarterienabgangs ein Gefäßclip gesetzt und die Nierenvenen durchtrennt. Sobald die Niere sich vollständig gelb-weißlich entfärbt hatte, wurde sie aus dem Situs entfernt und zur weiteren Aufarbeitung mit einem sterilen Skalpell zerteilt und für die PCR-Analyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Tötung des Tieres erfolgte durch Einschneiden des Diaphragmas. Im letzten Schritt wurde die Milz noch zügig entfernt, zerkleinert und

schockgefroren bzw. PBS-Lösung aufbewahrt. Das Tier wurde vorschriftsmäßig entsorgt.

3.4. Aufarbeitung der entnommenen Organe

Mittels real-time PCR-Analysen wurde die mRNA-Genexpression von Inflammationsmarkern, kostimulatorischen und Zelladhäsionsmolekülen sowie von antiapoptotischen Markern in Milz und Transplantatniere quantifiziert. Durchflusszytometrische Analysen der Empfängermilzen gaben durch Färbung von Oberflächenmarkern Rückschluss auf den Phänotyp der immunkompetenten Zellen innerhalb der Milz. Schließlich erfolgte die immunhistochemische Färbung des Transplantats der 24h und 14d Gruppe zur Bestimmung der Qualität der infiltrierenden Zellen.

3.4. Homogenisierung des Probenmaterials

Aufgrund des hohen RNase Gehalts in Geweben ist es erforderlich, dass das Probenmaterial sofort nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff schockgefroren wird. Um den Fehler, der durch unterschiedliche Genexpression an verschiedenen Stellen des Gewebes zustande kommt, zu minimieren, wurden möglichst große Gewebestücke komplett homogenisiert und anschließend aliquotiert. Die Probe wurde mit Lysispuffer und β-Mercaptoethanol in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mittels Ultra Turrax mit aufsteigender Geschwindigkeit homogenisiert. Bei der Homogenisierung wurde darauf geachtet, eine Gesamtzeit von 2 Minuten nicht zu überschreiten. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -70°C.

Gewebemenge (in mg)	Lysispuffer (in µl)	B-Mercaptoethanol (14,2M in µl)
5- 20	100- 250	0,7- 1,25
20- 25	350	2,5
25- 40	600	4,2

3.5. RNA-Präparation

Zur RNA-Präparation wurde das NucleoSpin RNA Kit von Fa. Macherey-Nagel verwendet. Bis zu 650µl der homogenisierten Probe wurden auf einen Prefilter in einem 2ml Reaktionsgefäß gegeben und 3 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Prefilters wurde das Filtrat mit dem gleichen Volumen an 70% Ethanol vermischt. 650µl dieses Gemisches wurden nun auf die RNA-Spin-Säule, die sich in einem 2ml Reaktionsgefäß befand, pipettiert und anschließend für eine Minute zentrifugiert. Soweit nicht anders angegeben wurde in diesen und den weiteren Zentrifugationsschritten die Durchflussfraktion jeweils verworfen und die RNA-Spin-Säule in ein sauberes 2ml Reaktionsgefäß umgesetzt. Nach vollständigem Durchsatz der Probe wurde die RNA-Spin-Säule mit 600µl niedrig konzentriertem Salz-Puffer gewaschen und eine Minute zentrifugiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Verdünnung von 5µl RNase-freie DNase mit 50µl DNA-Digestions-Puffer. Anschließend wurde die DNase auf die Säule pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte jeweils ein Waschschritt mit 600µl hoch konzentriertem Salz-Puffer (jeweils 1 min Zentrifugation), mit 600µl des niedrig konzentrierten Salz-Puffer (1 min Zentrifugation) und schließlich nochmals mit 300µl des niedrig konzentrierten Salz-Puffers (3 min Zentrifugation). Danach wurde die RNA-Spin-Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt, 1 Minute trocken zentrifugiert und in ein 1,5ml Elutionsgefäß gesetzt. Abschließend erfolgten zwei Elutionsschritte mit insgesamt 50µl des auf 60°C erwärmten Elutionspuffer, nach denen jeweils die Proben 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 1 Minute zentrifugiert wurden. Die Durchflussfraktion enthielt jetzt die gereinigte RNA und wurde nicht verworfen. Die RNA-Spin-Säule wurde nach erfolgter Elution entnommen und entsorgt. Die Proben wurden entweder direkt bei -80°C eingefroren oder zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Zur Quantifizierung der RNA-Konzentration vor der cDNA-Synthese wurde der Agilent Bioanalyzer 2100 (Fa. Agilent Technology) eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein computergestütztes Verfahren, welches auf dem Prinzip der Elektrophorese basiert. Auf einem, mit einem Gel gefüllten Chip wurden jeweils 12 der gewonnenen RNA-Proben aufgetragen, ein dreizehnter Ansatz enthielt eine Referenzprobe, die sich aus verschiedenen RNA-Molekülen bekannter Konzentration zusammensetzte (RNA 6000 Ladder). Zusätzlich wurde ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt und als dreizehnter Ansatz eine Referenzprobe. Diese Referenz enthielt sechs RNA-Fragmente unterschiedlicher Länge (zwischen 0,2 und 6kb) in fester Konzentration. Auf dem Chip

befinden sich Kapillarkanäle, durch welche die RNA nach Anlegen einer Spannung wandert und durch Fluoreszenzmessung (zwischen 670 und 700nm Wellenlänge) detektiert wird. Durch Messung der Durchlaufzeit kann auf die Größe der RNA-Fragmente und durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität auf die jeweilige RNA-Menge einer bestimmten Fragment-Länge geschlossen werden.

3.6. cDNA-Synthese

Zur Analyse der mRNA-Quantität in den gewonnenen Proben mittels rt-PCR müssen diese zunächst in DNA transkribiert werden. Die gewonnene DNA wird als cDNA (copy-DNA) bezeichnet und von genetischer DNA (gDNA) unterschieden. Sie bestand aus zwei Arbeitsschritten; im ersten Schritt fand eine Reaktion zur Elimination von gDNA statt, im zweiten die Reverse Transkription von RNA in cDNA. Zunächst wurde in einem 0,5ml Reaktionsgefäß die RNA vorgelegt, dabei wurden bis zu 18µl Lösung eingesetzt, maximal jedoch 2µg RNA. Anschließend erfolgte der Zusatz von soviel DEPC-Wasser (Diethyl Pyrocarbonate, add 1l dd H₂O), bis der Reaktionsansatz 18µl Gesamtvolumen enthielt. Zur Synthese der cDNA wurden Oligo-Desoxythymidin- (OdT-) Primer eingesetzt, die sich an den 3'-Poly A Schwanz der mRNA anlagern. Die 18µl Lösung wurde mit 2µl OdT-Primer (0,1mg/ml) gemischt. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden, wurden die Ansätze für 10 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend 2 Minuten auf Eis abgekühlt.

Folgender Mix wurde je Reaktionsansatz zugegeben:

8µL Reaktionspuffer (First Strand Buffer (FSB)/ Dithiothreitol (DTT))
4µL aqua dest
4µL dNTP (2.5mM)
2µL Ambion DNase (2U/µL)
0.5µL RNase-Inhibitor (40U/µL).

Durch die Zugabe der DNase und die anschließende 30-minütige Inkubation bei 37°C wurden DNA-Restkontaminationen eliminiert. Die DNase wurde bei 75°C inaktiviert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde 1µl Reverse Transkriptase und 1µl RNase-Inhibitor hinzugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte für 60 Minuten bei 42°C mit einem

abschließenden Enzymaktivierungsschritt bei 95°C für 5 Minuten. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Real-time-PCR bei -20°C aufbewahrt.

Reagenzien und Puffer:

DNAse RNasefrei: Ambion, Huntingdon, UK

RNAse Inhibitor: Promega, Madison, USA

dNTPs: Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Oligo-dT: Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

DEPC-H₂O: 1ml Diethyl Pyrocarbonate, add 1l dd H₂O, autoklavieren

Geräte:

Thermal Cycler: Perkin Elmer, Branchburg, USA

3.7. Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist seit ihrer Erstbeschreibung durch Mullis und Faloona [174] 1987 zu einem Standardverfahren der Molekularbiologie avanciert. Die konventionelle PCR ermöglicht eine effiziente Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA und wurde durch die rt-PCR (realtime-, Echtzeit-PCR), die eine zusätzliche Quantifizierung der ursprünglich im Probenansatz enthaltenen DNA-Menge erlaubt, erweitert.

3.7.1. Real-time-PCR (rt-PCR)

Die rt-PCR erlaubt im Gegensatz zur konventionellen PCR die Berechnung der DNA-Ausgangsmenge. Es wird ein Fluoreszenzsignal erzeugt, dessen Intensität proportional mit der Zahl der erstellten Kopien der DNA zunimmt. Zur Apparatur gehören ein Cycler und ein optisches Detektionsmodul, an welchem die Amplifikation analog mit einer photometrischen Messung verfolgt wird. Neben Farbstoffen, die sich in den neu synthetisierten Doppelstrang einlagern (z.B. Sybr-Green®), finden fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonukleotide (Sonden) Verwendung. Primer und Sonde liegen bei der Reaktion in wässriger Lösung vor, deren Konzentration bei der sog. Etablierung der Primer/Sondenkombination festgelegt wird. Die Sonde besteht aus einem DNA-Oligonukleotid (Sonde), das am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (Reporter, hier

FAM) und am 3'-Ende einen Unterdrückerfarbstoff (Quencher, hier TAMRA) trägt. Wird der Fluoreszenzfarbstoff durch Lichtabsorption aktiviert, kommt es in Gegenwart des Quenchers (d.h. bei intakter Sonde) zu einem Energietransfer vom Reporter zum Quencher. In Abwesenheit des Quenchers (bei degraderter Sonde) wird die Energie in Form von Fluoreszenzlicht abgegeben. Die Sonde ist komplementär zu einem Abschnitt des zu vervielfältigenden Gens (d.h. sie liegt zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer) und lagert sich während der Annealingphase analog der Primer an die DNA-Matrize an. Da die im Sondensystem verwendete Taqman®-DNA-Polymerase eine 5'-3' Exonukleaseaktivität besitzt, wird die an die Ursprungs-DNA gebundene Sonde während der Elongation degradiert. Dadurch kommt es zur räumlichen Trennung von Reporter und Quencher und zur Emission von Fluoreszenzlicht. Da pro DNA-Molekül und Reaktionsschritt genau eine Sonde angelagert und degradiert wird, steigt die Fluoreszenzintensität proportional zur Zahl der erstellten Kopien. Die Analysen mit Sondenpaneln wurden am ABI PRISM™ 7700 sequence detector durchgeführt. Wie bereits erwähnt, kann die real-time Quantifizierung von PCR Produkten auch mit Doppelstrang-DNA-bindenden Farbstoffen durchgeführt werden. Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität für doppelsträngige DNA ist der Farbstoff SYBR Green I für diese Anwendung besonders gut geeignet. Bei der Verwendung dieser Fluoreszenzfarbstoffe kann auf den Einsatz von TaqMan Sonden verzichtet werden. Sie interkalieren mit der DNA bzw. binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Die Messungen mit SYBR Green wurden am ABI PRISM™ 5700 sequence detector durchgeführt. Mit Hilfe der CCD-Kamera lässt sich die Fluoreszenzintensität kontinuierlich messen. Als Ergebnis der Messung erhält man eine Funktion, die die Fluoreszenzintensität auf die Zahl der bereits abgelaufenen Reaktionszyklen bezieht. Im linear ansteigenden Bereich des Graphen wird die Reaktionsgeschwindigkeit von dem im Überschuss vorliegenden DNA-Template bestimmt. Unter optimalen Bedingungen wird pro Reaktionsschritt jedes Template einmal kopiert, d.h. pro Schritt verdoppelt sich die DNA-Menge.

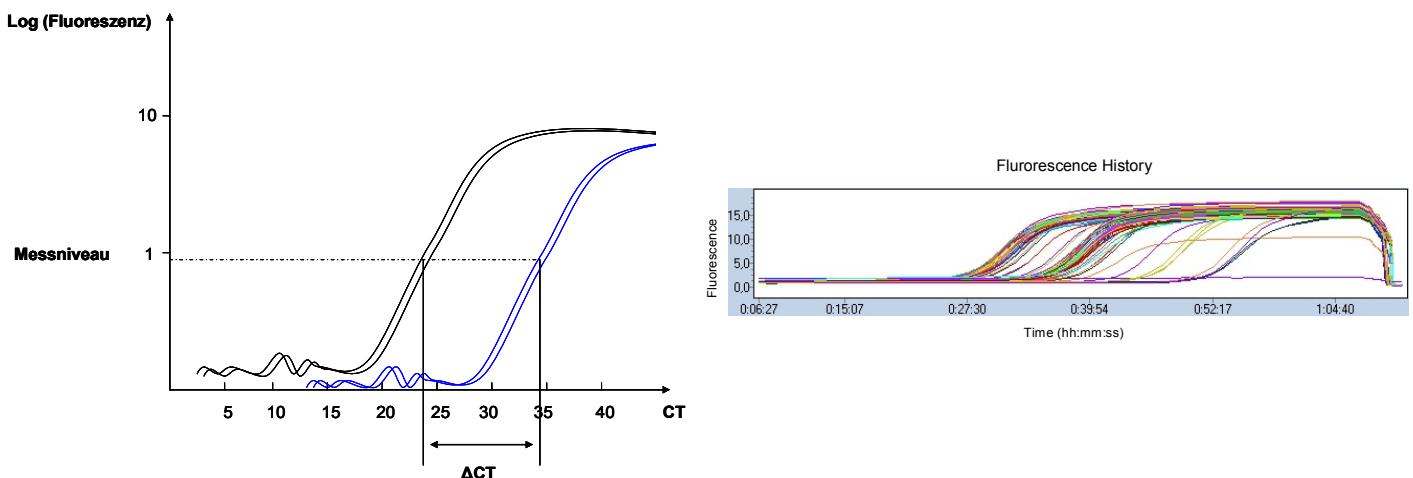


Abb. 11: Ergebnis einer rt-PCR schematisch (links) und Beispielbild (rechts). Im linearen Bereich der Kurve und oberhalb der Hintergrundfluoreszenz wird der Messbereich gesetzt. Die Reaktionszyklen Ct werden am Messniveau abgelesen und durch Differenzbildung und Potenzierung die relative Menge an cDNA errechnet. Um die Messgenauigkeit zu verbessern, verwendet man Doppelwerte, die nicht mehr als 0,5 Zyklen voneinander abweichen sollten. Überschreiten die Doppelwerte diese Grenze, wird die Messung wiederholt.

Die Quantifizierung der PCR beruht auf der Berechnung des Schwellenwertes (engl. Cycle of Threshold; Ct). Hier überschreitet die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant und die Amplifikation geschieht exponentiell ohne limitierende Faktoren wie Primer- bzw. Nukleotidmangel oder nachlassende Enzymaktivität. Der Ct-Wert kann zur absoluten Quantifizierung mit Hilfe einer Kalibrierkurve oder zur relativen Quantifizierung eingesetzt werden. In dieser Studie wurde durch den Bezug der Zielgenexpression auf ein nicht reguliertes Haushaltsgen relativ quantifiziert. Die Ct-Werte des Zielgens wurden auf die des Haushaltsgens normalisiert und dann miteinander in Beziehung gebracht. Es stehen zwei verschiedene Verfahren zur Quantifizierung der DNA-Ausgangsmenge zur Verfügung. Die absolute Quantifizierung bezieht den gemessenen Ct-Wert der Proben auf eine gleichzeitig gemessene Standardkurve, die aus logarithmischen Verdünnungen einer Referenzprobe bekannter Konzentration besteht. Die relative Quantifizierung misst zusätzlich zur Bestimmung des jeweiligen Gens bei den Messvorgängen ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen, das sogenannte Haushaltsgen. Durch Differenzbildung der Ct-Werte wird die relative Menge an Genprodukt bestimmt. Durch diese Standardisierung lassen sich Einflussfaktoren wie z.B. unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Proben minimieren. In der beschriebenen Studie wurde das Verfahren der relativen Quantifizierung mit dem Haushaltsgen „ β -Actin“ verwendet.

Eine Effizienz von ca. 1 vorausgesetzt, wurde die Normalisierung des Zielgens auf das Haushaltsgen mit Hilfe der folgenden Formel $2^{-\Delta Ct}$ vorgenommen:

$$\Delta C_t = \text{Mittelwert } C_t \text{ (Zielgen)} - \text{Mittelwert } C_t \text{ (Haushaltsgen)}$$

3.7.2. Etablierung einer Primer/Sonden-Kombination für die rt-PCR

Zur Etablierung eines real-time RT-PCR-Panels wurden die erforderlichen mRNA und DNA-Sequenzen der Internetdarenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) and National Library of Medicine (NLM) and National Institutes of Health (NIH)“ entnommen und die Exon-Intron-Grenzen festgestellt. Primer und Sonden wurden mittels der Software „Primer Express“ der Firma Applied Biosystems unter vorgeschriebenen Voraussetzungen ausgewählt. Die Länger der Primer sollte 18-25 bp betragen, der Guanin (G)-Cytosin (C)-Gehalt bei ca. 50% liegen und sie sollten keine Poly-Thymin (T)-Bereiche enthalten. Um eine Bildung von Primer-Dimeren vorzubeugen, sollte vor allem am 3'-Ende nur eine geringe Komplementarität zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer vorhanden sind. Eine Schmelztemperatur von $60 \pm 1^\circ\text{C}$ ist empfohlen. Um eine mRNA-spezifische Amplifikation zu erreichen, wird die Sonde mittig über die Exongrenzen gesetzt. Weiterhin wird der Energietransfer verbessert und quenchende Einflüsse minimiert, indem das 5'-Ende in relative Nähe zum 3'-Ende des Primers platziert wird. Die empfohlene Sondenlänge beträgt 20-30 bp mit einem maximalen GC-Gehalt von 60%. Dabei sollte eine Abfolge von drei gleichen Basen in der Sondensequenz insbesondere Poly-Gs vermieden werden. Die Schmelztemperatur der Sonden liegt um $7-10^\circ\text{C}$ höher als die der Primer. Nach Abschluss des Sonden-Designs wird die Sonde auf dem Strang bestellt, der mehr C als G enthält. Die von Metabion hergestellten Primer wurden auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/ μL verdünnt und mit einer konventionellen PCR getestet.

Folgender Mix wurde je PCR Ansatz zugegeben:

Reaktionsansatz	
17,9µl	Steriles Wasser
2,5µl	PCR-Puffer
1,5µl	MgCl ₂ (5mM)
1,0µl	dNTP (2,5mM)
0,5µl	Forwardprimer (10pmol)
0,5µl	Reverseprimer (10pmol)
0,1µl	Taq-Polymerase
1µl	cDNA

Das standardisierte PCR-Programm lautet folgendermaßen:

1.	5 min 94°C
2.	30 sec 94°C 30 sec 60°C } 40 Zyklen 60 sec 72°C
3.	10 min 72 °C

Bevor die Proben auf ein 2% Agarosegel aufgetragen wurden, wurden sie mit 5 µl Ladepuffer versetzt. Wurde die erwartete Produktgrösse bestätigt und traten keine Koprodukte oder starke Primer-Dimere auf, wurden die Primer für ein SYBR Green Panel benutzt oder zusätzlich eine Sonde bestellt und diese auf eine Arbeitskonzentration von 5 pmol/µL eingestellt. Die Primertritration erfolgte mit einer für das zu etablierende Panel stark positiven cDNA. Für das Sondensystem wurde eine Primerkonzentration gewählt, die einen möglichst frühen Ct-Wert und die höchste Fluoreszenzintensität erreichte. Für SYBR Green System wurde die Primerkombination genutzt, die in der geringsten Ausbildung von Primer-Dimeren bei ausreichend starkem Fluoreszenzsignal resultierte. Schließlich erfolgt die Effizienzbestimmung mittels

Standardkurvengenerierung. Hierfür erstellte man eine geometrische Verdünnungsreihe der cDNA. Zunächst wurden die ΔCt -Werte durch Differenzbildung aus den Ct-Werten des Haushaltsgens und denen des Zielgens ermittelt. Anschließend wurden diese gegen den dekadischen Logarithmus der Verdünnungsstufen aufgetragen und so ein linearer Funktionsgraph generiert. Betrug die Steigung der Ausgleichsgraden weniger als 0,1, wurde das Panel für effizient und damit etabliert erklärt.

3.7.3. Durchführung der rt-PCR

Das verwendete Volumen betrug 13 μ l. Pro Reaktionsansatz wurden 6,25 μ l Mastermix, 3 μ l Primermix, 0,5 μ l Sonde, 2,25 μ l aqua dest sowie 1 μ l cDNA verwendet. Das kommerziell erhältliche Mastermix enthielt Puffer, dNTP, Taq-Polymerase und bei Verwendung von SYBR Green I zusätzlich den interkalierenden Farbstoff. In Ansätzen des SYBR Green Systems wurde keine Sonde hinzugesetzt, allerdings 2,75 μ l statt 2,25 μ l aqua dest verwendet. Die Sonden und Primer wurden etabliert und die Konzentration der Primer für eine optimale Amplifikationseffizienz titriert. 12 μ l der Mischung wird zu 1 μ l in einem speziellen Reaktionsgefäß (Optical Tube) vorgelegten cDNA gegeben. Jeweils 96 Reaktionsgefäße können auf einer Reaktionsplatte zu einem Messansatz kombiniert werden und gleichzeitig gemessen werden. Da die rt-PCR ein hochsensitives Messverfahren ist, ist es erforderlich, Negativkontrollen mitzuführen. So wird pro Messvorgang 12 μ l der Mischung ohne cDNA als sog. No-Template-Control (NTC) mitgemessen, um eine eventuelle Kontamination der Reagenzien auszuschließen. Das Reaktionsgefäß wird mit einem Verschluss aus durchsichtigem Plexiglas (Optical Cap) fest verschlossen und kurz zentrifugiert, um Luftblasen im Gefäß zu entfernen. Anschließend wird die Reaktionsplatte in den PCR-Thermocycler gestellt und die Messung gestartet. Das standardmäßig verwendete PCR-Programm beinhaltete 4 Schritte. Im ersten Segment wurden „Carry-over-Fragmente“ für 2 min bei 50°C verdaut, dann das Enzym bei 95°C für 10 min inaktiviert. Für 40 Zyklen erfolgte der Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 sec, die Annealing- und Extensionsschritte bei 60°C für 60 sec. Zum Beweis der Reproduzierbarkeit wurden für alle Proben Doppelansätze pipettiert, wobei der Ct-Wert nicht mehr als 0,5 Zyklen voneinander abweichen durfte. Nach Ablauf der PCR Analyse wurden die Daten digital

gespeichert und die verwendeten Proben verworfen. Die Auswertung wurde im Sinne der relativen Quantifizierung durchgeführt, wie sie oben bereits beschrieben wurde.

3.8. Durchflusszytometrische Untersuchung (FACS)

3.8.1. Methode

Die Durchflusszytometrie ermöglicht durch Analyse von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Strukturen sowie qualitative und quantitative Aussagen über den Phänotyp und die Funktion der zu untersuchenden Zellsuspension zu treffen. Die Zellen werden hierbei mit fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen bestimmte Oberflächen- oder intratelluläre Strukturen markiert, die für den Versuch von Interesse sind. Die markierten Zellen werden dann in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen fokussierten Laser geleitet. Hierbei erzeugen die Zelleigenschaften Größe, Membranbeschaffenheit und Granularität der zu untersuchenden Zellen eine Lichtstreuung, die einerseits von einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Forward-scatter) sowie andererseits einer dazu rechtwinklig angeordneten Linse gebündelt und photometrisch erfasst werden. Das Vorwärtsstreuulicht (FSC) wird vornehmlich durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreuulicht (SSC) durch die Granularität der Zellen erzeugt. Eine korrelierte Messung zwischen FSC und SSC erlaubt eine Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen einer heterogenen Zellpopulation anhand ihrer morphologischen Eigenschaften. Durch Eingrenzung (Gating) der Zellpopulation von Interesse kann diese nun durch Analyse der Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper auf die Expression der Oberflächen- oder intrazellulären Strukturen weiter untersucht werden (Abb. 12).

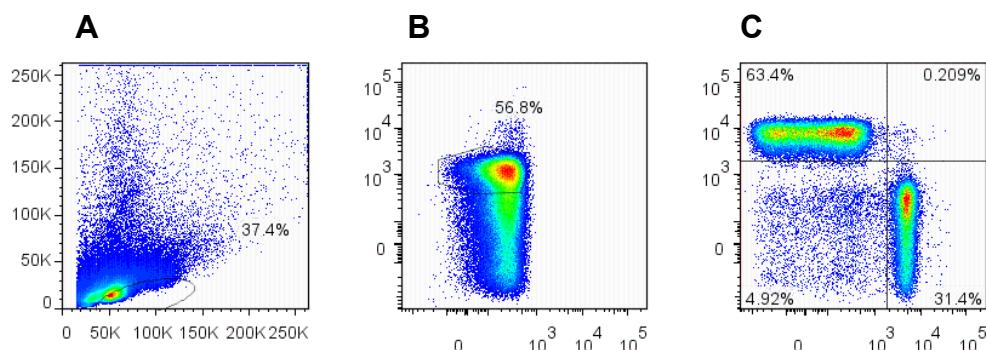


Abb. 12: Durch Eingrenzung (Gating) lassen sich die Populationen von Interesse genauer differenzieren. (A) [FSC/SSC] Gating auf Lymphozytenpopulationen, (B) [Aqua/CD3] Gating auf lebende T-Zellen, (C) [CD8/CD4] identifiziert CD4+ und CD8+ T-Zellen.

Die Antikörper gekoppelten Fluorochrome werden durch den Laser zur Emission von Lichtquanten definierter Wellenlänge angeregt, die wiederum durch Linsen gesammelt und von Filtern nach den verschiedenen Wellenlängenbereichen aufgetrennt und zu unterschiedlichen Detektoren gelenkt werden. Jeder Farbstoff erzeugt ein spezifisches Signal, so dass die Fluorochrome bei der Mehrfarbenanalyse getrennt akquiriert und quantitativ ausgewertet werden. Die gemessene Fluorochromintensität verhält sich dabei proportional zur Anzahl pro Zelle gebundener Antikörper und damit zu den untersuchten Oberflächen- oder intrazellulären Strukturen. In der vorliegenden Arbeit wurde BD FACSCalibur als Zytometer verwendet, welches ein 2 Laser-System beinhaltet (FACSCalibur: Argon, $\lambda = 488\text{nm}$ und He-Ne, $\lambda = 635\text{nm}$) und eine Verwendung von bis zu 4 Fluorochromen ermöglicht. Um eine unspezifische Antikörperbindung von einer spezifischen unterscheiden zu können, erfolgt die sogenannte Isotypkontrolle. Hierbei werden die Zellen mit einem unspezifischen Antikörper markiert. Zellen weisen freistehende Proteinbrücken auf, die zu einer unspezifischen Antikörperbindung führen können. Deren Definition ermöglicht die Unterscheidung zur spezifischen Antikörperfluoreszenz. Der Isotyp wird in der gleichen Menge wie der zu untersuchende Antikörper eingesetzt, da er sowohl in seinem Proteingehalt als auch in seinen Fluorochrom-Eigenschaften letzterem ähnlich ist

3.8.2. Durchführung

Die durchflusszytometrische Färbung der Zellen der Empfängermilzen diente in der vorliegenden Arbeit der Charakterisierung des Phänotyps immunkompetenter Zellen und der Herausarbeitung etwaiger Unterschiede der Zellpopulationen innerhalb der Milz zwischen Simvastatin behandelten Tieren und den Kontrollen. Zunächst wurden die Milzen in einer sterilen Petrischale in RPMI-Medium (RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin) zerkleinert und die Suspension durch den Cell Strainer ($70\mu\text{m}$) filtriert. Dann erfolgte die 5 minütige Zentrifugation des Filtrats bei 4°C . Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10ml RPMI-Medium aufgenommen und vermischt. Zur Lyse der Erythrozyten fügten wir 20ml steriles Aqua dest hinzu, vermischten die Probe und füllten sie nach 10 Sekunden mit RPMI-Medium auf. Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, 4°C) wurde wiederum

der Überstand verworfen und das Pellet mit 30ml RPMI-Medium resuspendiert und auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml (980 μ l Trypanblau + 20 μ l Zellsuspension) eingestellt. Vor der Färbung erfolgte zunächst noch ein Waschschnitt mit 2ml FACS-Puffer, anschließender Zentrifugation, dekantieren und vortexen des Pellets. Zur Charakterisierung der T-Zellen verwendeten wir einerseits anti-CD3-FITC (Fa. BD) sowie andererseits anti-CD4-APC (Fa. BD) sowie zur Identifizierung den für Ratten spezifischen B-Lymphozyten-Marker anti-CD45RA-PE (Fa. BD). Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C erfolgten 2 weitere Waschschnitte mit FACS-Puffer und schließlich die Fixierung der Zellen mit 1ml 1% Paraformaldehyd. Die Messung wurde mit einem FACSCalibur-Gerät (Fa. Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA) gemessen, mittels der „Cell Quest“-Analyse-Software (Fa. Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA) ausgewertet und in Dot-plot-Diagrammen graphisch dargestellt.

3.8.3. Antikörperauswahl

Folgende Antikörper der Firma Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland wurden eingesetzt:

- Maus Anti-Ratte CD4 (CD4+ T-Helferzellen), Klon RM4-5, APC konjugiert, Isotyp IgG2a, κ
- Maus Anti-Ratte-CD3 (T-Zellen), Klon G4.18, FITC konjugiert, Isotyp IgG3, κ
- Maus Anti-Ratte CD45RA (B-Lymphozyten) Klon OX-33, PE konjugiert, Isotyp IgG1, κ

3.9. Immunhistochemische Untersuchung

3.9.1. Durchführung

Die immunhistochemische Untersuchung wurde mittels APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)-Methode, die bereits in den 1980ern beschrieben und seither gut etabliert ist [175]. Zunächst wurden 4 μ m dicke Gefrierschnitte der schockgefrorenen Transplantate mit Hilfe eines Kryotoms (Microm HM 500 OM) angefertigt und nach 10 minütiger Acetonfixierung luftgetrocknet. Die

Schnitte wurden mit einem Dako-Pen umrundet und dann mit einer Verdünnungslösung (trisgepufferte NaCl-Lösung (Waschpuffer) + 1% BSA) zur Minimierung der unspezifischen Hintergrundfärbung für 30 min. inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Auftragung des Primär-Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung und eine anschließende 90 minütige Inkubation. Nach dem darauffolgenden dreimaligen Waschvorgang mit Waschpuffer in Färbeküvetten wird der Sekundär-Antikörper (Rabbit-anti-Mouse-Ig; Dako) aufgetragen (in einer 1:150 Verdünnung mit Waschpuffer) und 60 min inkubiert. Anschließend wird der dreimalige Waschschnitt mit Waschpuffer wiederholt und im Anschluss der APAAP-Komplex aufgetragen und erneut für 60 min. inkubiert. Nach einem letzten dreimaligen Waschschnitt mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation für 10 Minuten mit dem Substrat/Chromogen-System; als Substrat für die alkalische Phosphatase diente Naphtol AS-BI Phosphat, als Farbstoff Neu-Fuchsin (Naphtol AS-BI Phosphat). Die Schnitte wurden letztendlich mit Leitungswasser gewaschen und mit Hämatoxylin gegengefärbt. Bildaufnahmen und Mikroskopie erfolgten mit dem Carl Zeiss Axio Observer Z1 und der AxioCam Mrm Icc3 von Zeiss. Die Bearbeitung des Bildmaterials wurde mit der AxioVision (4.8.2.) Software durchgeführt.

3.9.2. Antikörperauswahl

Folgenden Antikörper der Fa.Serotec, Wiesbaden, Deutschland wurden verwendet:

- Mouse Anti-Rat ED1 (Monozyten/Makrophagen), Klon ED1, Isotyp Maus IgG1,
- Mouse Anti-Rat CD4 (CD4+ T-Helfer Zellen), Klon W3/25, Isotyp Maus IgG1
- Mouse Anti-Rat CD8 (zytotoxische T-Zellen), Klon MRC OX8, Isotyp Maus IgG
- Mouse Anti-Rat I-A (MHC-Klasse II, Ia-Antigene), Klon OX3, Isotyp Maus IgG1
- Rabbit Anti-Mouse Ig (Sekundärantikörper); Dako Z-0259
- APAAP, mouse, monoclonal; DAKO D-0651

3.10. Untersuchungen im Stoffwechselkäfig

Zur Bestimmung der Nierenfunktion wurden die Tiere nach dem Wiegen an Tag 50 und Tag 90 für 24h in Stoffwechselkäfige gesetzt, in denen sie freien Zugang zu Futter und

zu einer definierten Menge an Wasser hatten. Nach 24h wurde die Ein- und Ausfuhr der Tiere protokolliert und eine Urin- sowie eine Blutprobe in den Laboren für klinische Chemie in unserem Haus zur Messung der Serum- und Urin-Kreatinin-, -elyktrolyt- sowie -proteinkonzentrationen geschickt. Die Blutentnahme erfolgte aus dem retroorbitalen Venenplexus.

3.11. Berechnung der Glomerulären Filtrationsrate und der Proteinurie

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wird als das pro Zeiteinheit von den Glomerula filtrierte Volumen definiert und wird in ml/min angegeben. Zur Ermittlung der GFR wird der Quotient aus Kreatinin im Urin und Kreatinin im Serum mit dem Harnzeitvolumen in ml/min multipliziert.

$$GFR = ([\text{Kreatinin}]_{\text{Urin}} \times \text{HZV}) / [\text{Kreatinin}]_{\text{Serum}}$$

3.12. Statistische Auswertung

Aus den gewonnenen Daten wurden Mittelwerte und Streuungsmaße errechnet. Die Prüfung der Signifikanz der Daten für rt-PCR und FACS erfolgte mit dem Students t-Test bzw. dem Mann- Whitney Test für nicht parametrische Werte und wurden mit dem Programm Graphpad Prism ermittelt. Als statistisch signifikant gilt ein p-Wert <0,05. Die Daten werden als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung dargestellt..

Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Spendervorbehandlung in Bezug auf die HO-1 Expression in den Spendern, sowie der Expression weiterer im Rahmen des IRS bedeutenden Marker, welche Modulationen in der Antigenprozessierung, -präsentation sowie in der Aktivierung der adaptiven Immunantwort anzeigen. Weiterhin wird die Qualität der Transplantat infiltrierenden Zellen mittels Immunhistochemie sowie der dominierenden Zellpopulationen in den sekundär lymphatischen Organen (SLO) durch Durchfluszytometrie veranschaulicht und diese Ergebnisse schließlich im Langzeitverlauf mit der Organfunktion der Transplantatniere korreliert. Nach dreitägiger Vorbehandlung der Spender mit Simvastatin und darauffolgender Transplantation wurden die Empfängertiere nach 24 Stunden, 14 Tagen bzw. 6 Monaten geerntet. Tiere, die vor den festgesetzten Zeitpunkten verstarben, wurden autopsiert zur Feststellung der Todesursache. Aufgrund von Komplikationen (operativ-technische Fehler, Infektionen) verstorbene Ratten wurden nicht den anschließenden Untersuchungen zugeführt und aus dem Versuch ausgeschlossen.

4.1. Genexpressionsanalyse der Hämoxxygenase-1 in den Spenderorganen Milz, Leber und Niere

Bezüglich der Frage nach der Induzierbarkeit von HO-1 durch Simvastatin untersuchten wir in der PCR-Analyse die Genexpression der Hämoxxygenase in den Organen des Spenders (Milz, Leber, native Niere). Lee et al. beschrieben eine signifikante Hochregulation der HO-1 bereits nach einmaliger intraperitonealer Injektion von 5mg/kg Simvastatin in C57BL/6J Mäusen, die auch nach 24h noch nachweisbar blieb [144]. Wie Abb. 13 jedoch veranschaulicht, konnten wir diese Induktion trotz deutlich höherer Dosis von 10mg/kg und sogar dreitägiger Vorbehandlung der Spender nicht nachvollziehen. Es zeigte sich keine Induktion der HO-1 in den Spenderorganen Milz, Leber und Niere in den behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen.

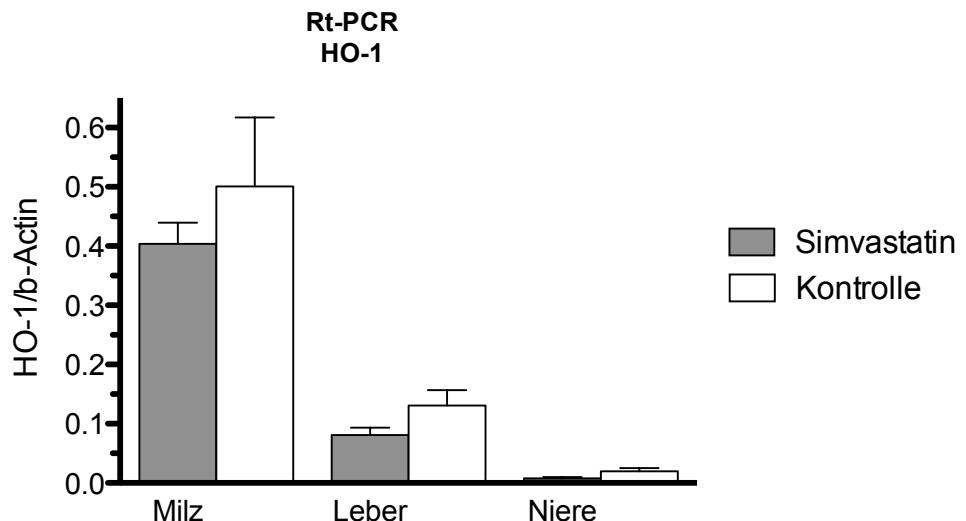


Abb. 13: mRNA-Genexpressionsanalyse von HO-1 in der Milz, Leber und Niere des Spenders nach dreitägiger Simvastatinapplikation zeigte keinen Unterschied zu Kontrollgruppe. (n=5)
(t-Test nach Mann-Whitney)

4.2. Phänotypisierung graft-infiltrierender Zellen und Zellen der sekundären lymphatischen Organe

Um die Qualität der Transplantat infiltrierenden Zellen zu untersuchen, führten wir zunächst eine immunhistochemische Färbung der Transplantats für CD4+, CD8+ Zellen, ED-1+ Monozyten (ein spezifischer Ratten-Monozyten- und Makrophagenmarker) und Ox-3+ (MHC-Klasse-II) antigenpräsentierenden Zellen (APC) nach 24h und 14d durch. Abb. 14 zeigt repräsentative Ausschnitte der immunhistochemischen Färbungen, wohingegen Abb. 15 die Isotypkontrollen dazu darstellt. Auffallend sind die nach 14d v.a. perivaskulär gelegenen CD4+ Lymphozyteninfiltrate in den Transplantaten sowohl in den vorbehandelten als auch in den Kontrolltieren, welche nach 24h deutlich geringer ausgeprägt bzw. in den Simvastatin vorbehandelten Tieren noch nicht nachzuweisen sind. CD8+ T-Zellen sind sowohl nach 24h als auch nach 14d in ihrer Ausprägung deutlich geringer als CD4+ T-Helferzellen. Dies könnte auf die Wahl des chronischen Fischer-Lewis-Modells in der vorliegenden Arbeit zurückgeführt werden [176], in dem chronische Transplantatveränderungen vor allem durch CD4+ T-Helferzellen vermittelt werden. Nach 24h dominiert zunächst nur eine unspezifische Antwort durch ED-1+ Monozyten-

und Makrophagen, die in beiden Gruppen gleichermaßen vorzufinden ist. Nach 14d ist die Infiltration der ED-1+ Zellen sowohl in den Kontrollen als auch in den vorbehandelten Tieren deutlich verstärkt, zeigt jedoch im Gegensatz zu den Lymphozyten eher einer peritubuläre und interstitielle Ausprägung. Auch Ox-3+ (MHC-Klasse-II) APCs sind bereits früh nach 24h nachweisbar und läuten den Entzündungsprozess und die sich im Verlauf entwickelnde spezifische Immunantwort ein. Analog zu den Monozyten lassen sich auch diese Zellen nach 14 Tagen in beiden Gruppen gleichermaßen verstärkt und vor allem interstitiell nachweisen.

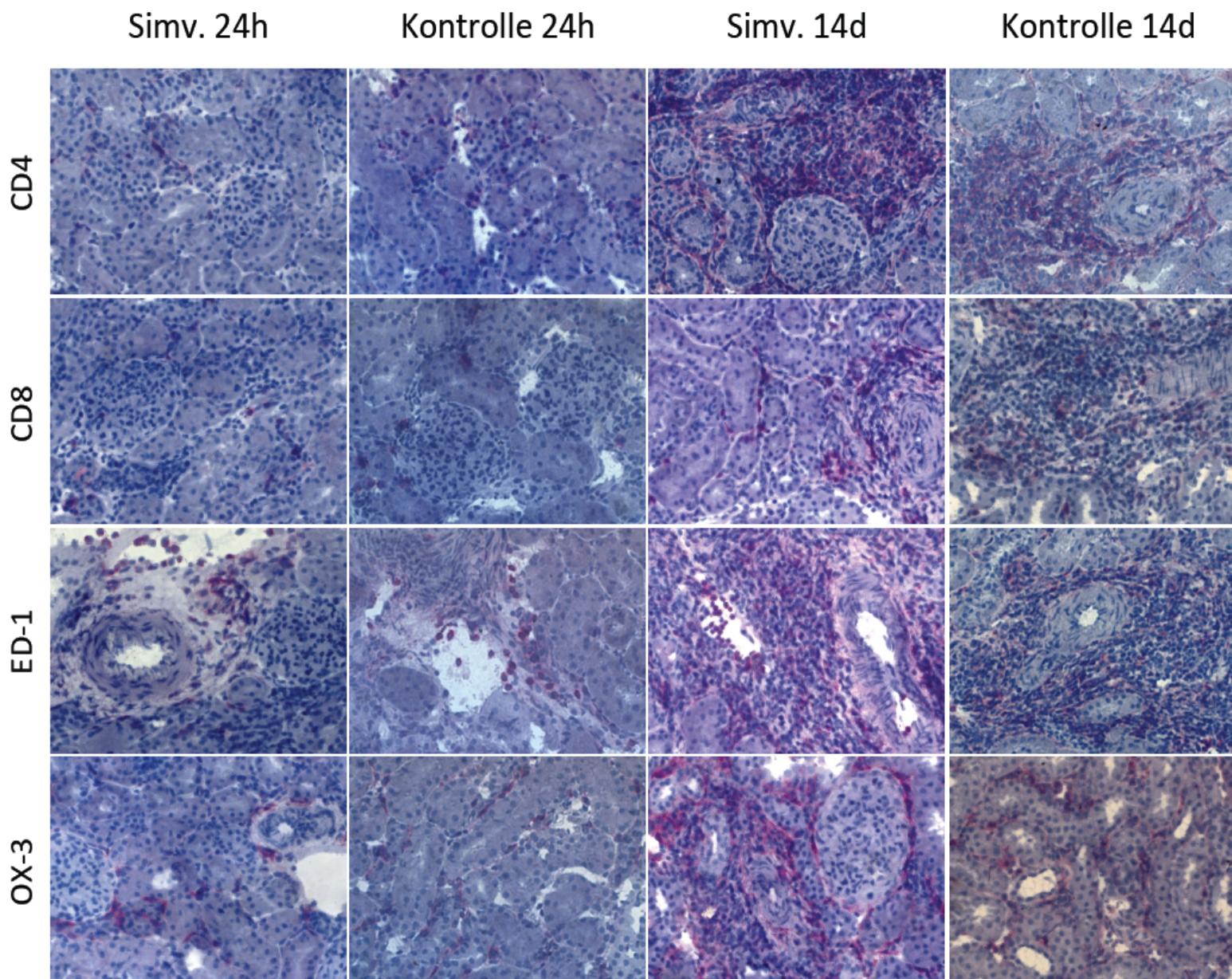


Abb. 14: Immunhistochemische Färbung von CD4+, CD8+ T-Zellen, ED-1+ Monozyten und Makrophagen, Ox-3+ (MHC-Klasse-II) Zellen im renalen Transplantat repräsentativer Tiere der mit Simvastatin vorbehandelten Gruppe und der Kontrollen. 40fache Vergrößerung.

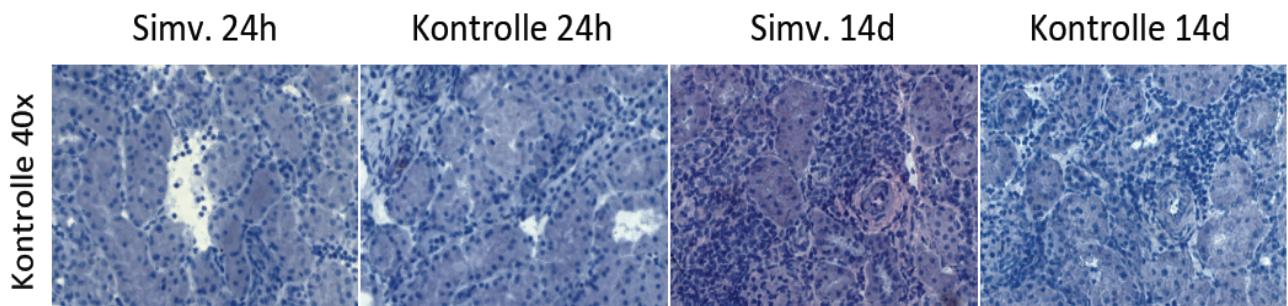


Abb. 15 Immunhistochemie, Isotypkontrolle in 40facher Vergrößerung.

Nachdem sich immunhistologisch zwar deutliche Unterschiede in der Qualität der Transplantatinfiltration infiltration nach 24h und nach 14 Tagen, nicht jedoch zwischen der Simvastatin behandelten Gruppe und den Kontrolltieren ergaben, erfolgte die Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Zellpopulationen in den Empfängermilzen nach 24h und 14d.

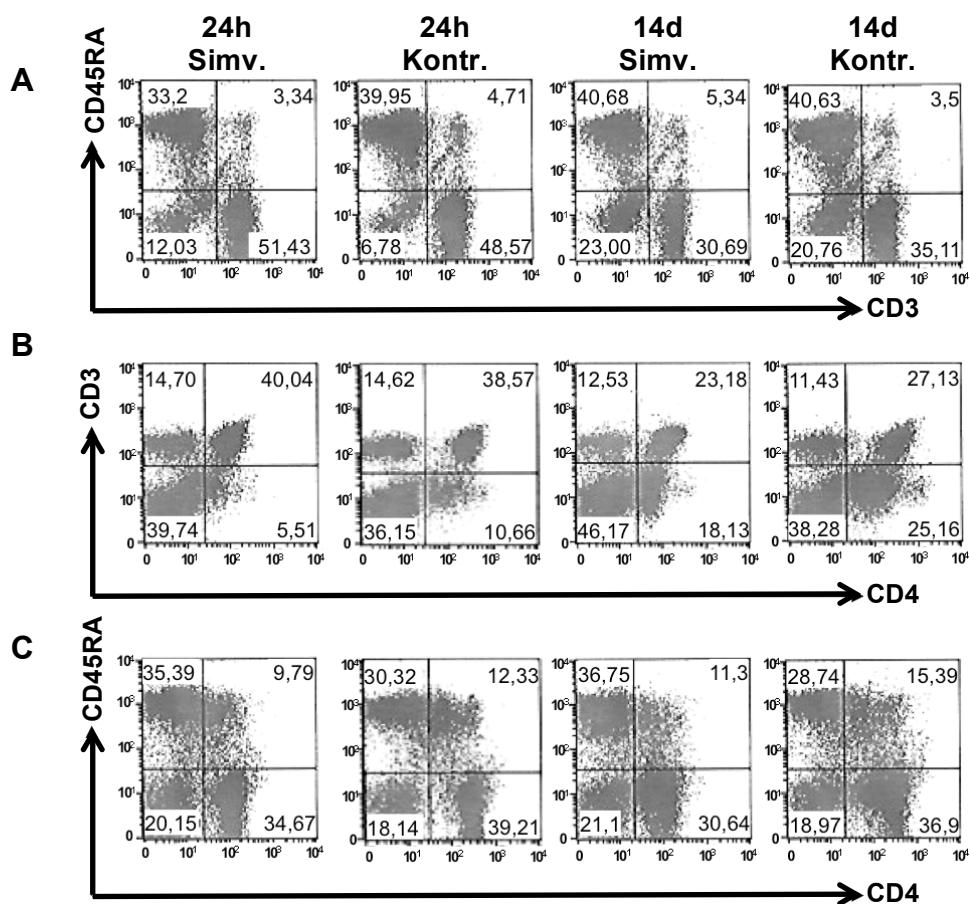


Abb. 16: Dot-Plot-Darstellung der durchflusszytometrischen Auswertung repräsentativer vorbehandelter und Kontrolltiere nach 24h und nach 14d. (A) CD45RA/CD3, (B) CD3/CD4, (C) CD45RA/CD4.

Abb. 16 stellt Dot-Plots repräsentativer Tiere der einzelnen Gruppen dar. Zur Charakterisierung der dominierenden Zellpopulationen der sekundär lymphatischen Organe wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD45RA, CD4 und CD3 gefärbt. Anti-rat-CD45RA-AK ist ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen B-Lymphozyten in Ratten. Antikörper gegen CD3 kennzeichnen T-Lymphozyten in ihrer Gesamtheit, wohingegen T-Helferzellen zusätzlich noch CD4 auf ihrer Oberfläche exprimieren (CD3+CD4+). In der vorliegenden Arbeit wurde nicht explizit für CD8+ T-Zellen gefärbt, allerdings stellt Abb. 17 eine CD3+CD4- T-Zellpopulation dar, die den CD8+ T-Zellen weitestgehend entspricht. Die Abbildung zeigt jedoch, dass sich keine signifikanten Unterschiede der CD3+CD4-(CD8+) Zellpopulationen zwischen den vorbehandelten und den Kontrolltieren ergaben.

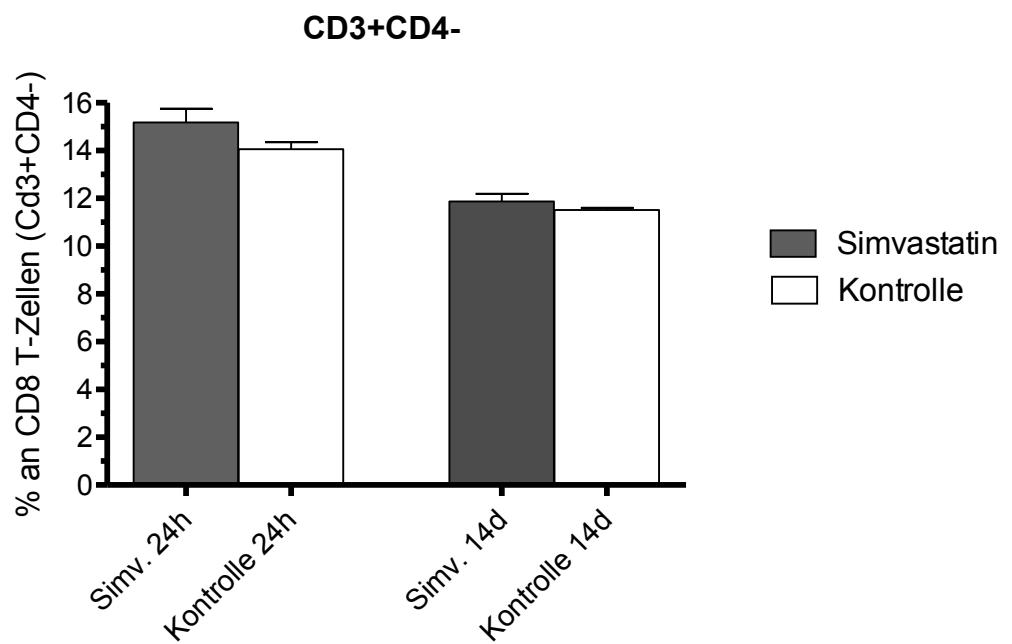


Abb. 17: Histogramm-Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten CD3+CD4- T-Zellpopulation in der Milz der vorbehandelten und Kontrolltiere nach 24h und 14d. (n=5 je Behandlungsgruppe und Analysezeitpunkt) (kein signifikanter Unterschied, t-Test nach Mann-Whitney).

Abb. 18 trägt die durchflusszytometrisch gemessenen Populationen als Histogramm gegeneinander auf. Abb. 18a demonstriert, dass eine Spendervorbehandlung mit Simvastatin in einer signifikant reduzierten Frequenz von CD4+ Zellen in der Milz nach 24h resultierte ($*p=0,0264$) und nach 14d gleichfalls noch nachweisbar war ($**p=0,006$), Abb. 18b. Interessanterweise handelt es sich hierbei nicht um eine Reduktion der

CD3+CD4+ T-Helferzellen, welche weder nach 24h noch nach 14d Veränderungen in ihrer Ausprägung zeigten, sondern um eine signifikante Minimierung der CD3-CD4+ Monozytenpopulationen ($*p=0,0071$ nach 24h, $*p=0,01$ nach 14d). Die Frequenzen der T- und B-Zellpopulationen wiesen weder nach 24h noch nach 14d signifikante Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen auf.

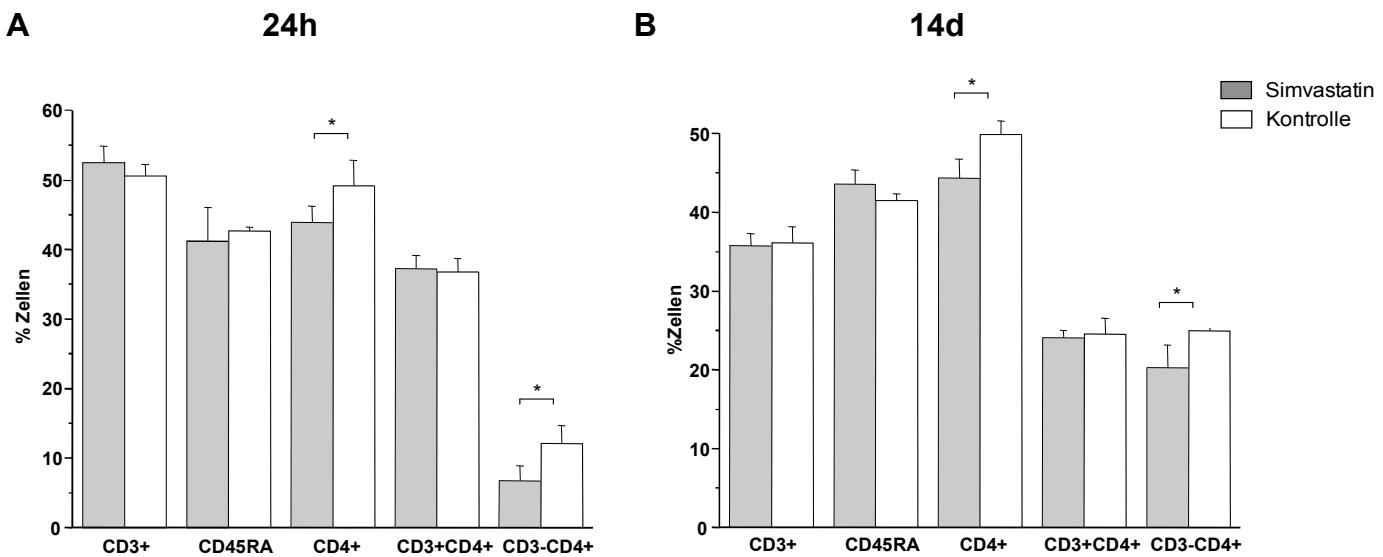


Abb. 18: Histogramm-Darstellung der durchflusszytometrisch gemessenen Populationen. (A) 24h. Signifikante Herrunterregulation der CD4+ Zellen ($p=0,0264$) und CD3-CD4+ Monozyten und Makrophagen ($p=0,0071$) in den Milzen der vorbehandelten Gruppe. (B) 14d. Ebenfalls signifikante Herrunterregulation der CD4+ Zellen ($p=0,006$) und CD3-CD4+ Monozyten und Makrophagen ($p=0,01$) in den Milzen der vorbehandelten Gruppe. (n=5 je Behandlungsgruppe und Analysezeitpunkt, t-Test nach Mann-Whitney)

Diese Reduktion der CD3-CD4+ Monozyten/Makrophagen geht mit einer in der rt-PCR beobachteten Reduktion der MHC-Klasse-II-Genexpression einher. Dieses Oberflächenmolekül wird auf dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen ausgeprägt und dient zusammen mit weiteren kostimulatorischen Signalen der Antigenpräsentation zur T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung. In der rt-PCR lässt sich in der Milz nach 24h und nach 14d nur eine moderate Tendenz der MHC-Klasse-II-Reduktion erkennen (Abb. 19). Im Langzeitverlauf nach 6 Monaten zeigt sich jedoch eine drastische hoch signifikante Herrunterregulation der Genexpression von MHC-Klasse-II ($p=0,0061$). Analog zu den immunhistochemischen Beobachtungen erbrachte die MHC-Klasse-II-Genexpression in der Niere keinerlei Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren.

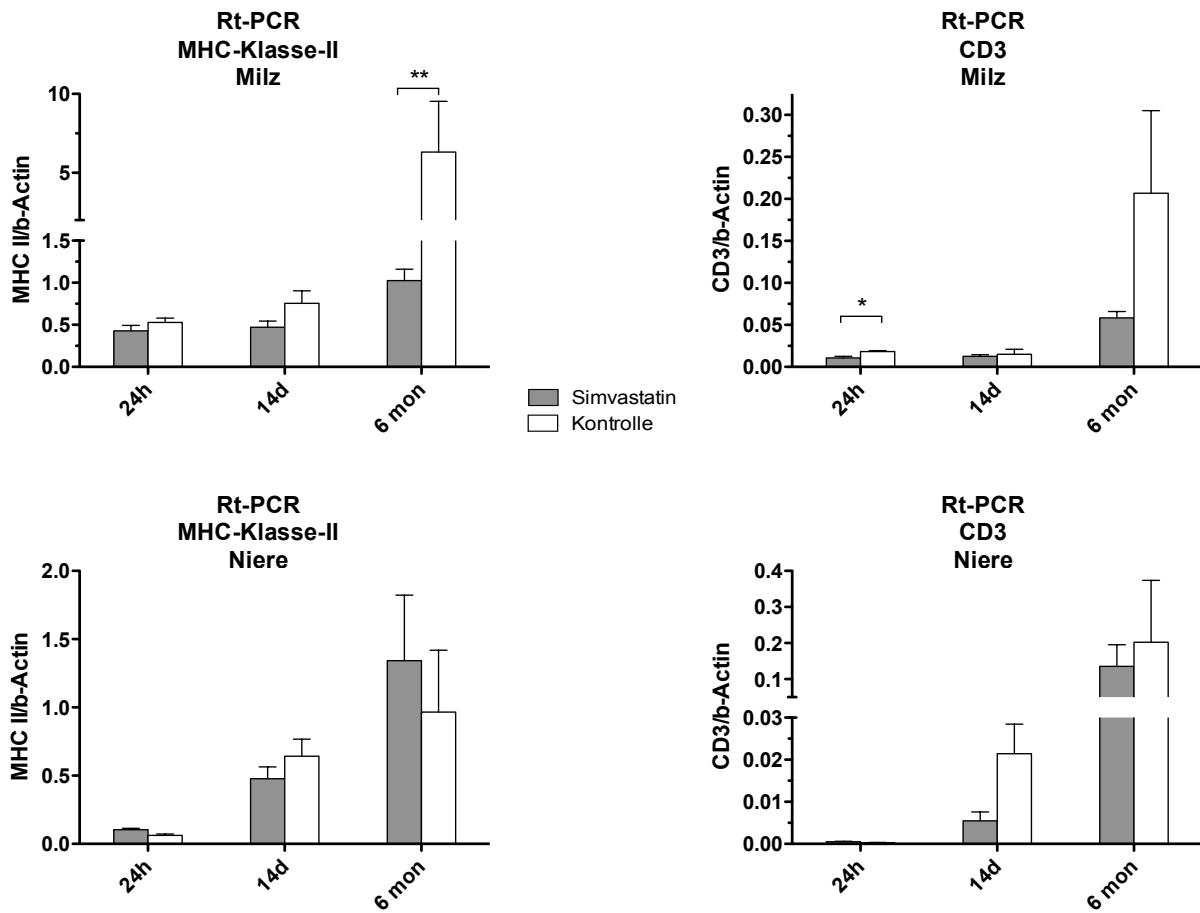


Abb. 19: mRNA Genexpression (rt-PCR) von MHC-Klasse-II und dem CD3-T-Zellmarker in Milz und Allograft. Signifikante Reduktion von MHC-Klasse-II in der Milz der mit Simvastatin vorbehandelten Empfänger im Vergleich zu den Kontrollen nach 6 Monaten ($p=0,0061$, t-Test nach Mann-Whitney) und von CD3 nach 24h in der Milz der vorbehandelten Tiere ($p=0,0317$, t-Test nach Mann-Whitney). (n=5 je Behandlungsgruppe und Analysezeitpunkt)

Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie zeigte die rt-PCR eine deutliche Reduktion der CD3-Genexpression, welche jedoch ausschließlich nach 24h eine Signifikanz erreichte ($p= 0,0317$), dennoch auf eine reduzierte spezifische Immunantwort nach Vorbehandlung hindeutet. In diesem Kontext spielen als zweites Signal zur T-Zell-Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen neben MHC-Molekülen auch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 eine bedeutende Rolle. Durch das CTLA4-Ig Fusionsprotein Belatacept, welches die Interaktion zwischen dem auf T-Zellen exprimiertem Oberflächenmolekül CD28 und den APC-Oberflächenmarkern CD80/CD86 inhibiert, hat die Blockade dieser kostimulativen Bindung mittlerweile bereits in der Klinik Anwendung gefunden [177].

In Anbetracht der Reduktion der APCs in der Durchflusszytometrie sowie der MHC-Klasse-II- und CD3-Genexpression in der rt-PCR untersuchten wir die Genexpression

von CD80 und CD86 in der Empfängermilz und im Transplantat im Kurzzeit- und im Langzeitverlauf. Die Spendervorbehandlung mit Simvastatin erbrachte in der Milz nach 24h und 14d nur minimale Reduktionen der Genexpression dieser Marker, welche nach 6 Monaten drastischer erkennbar war, jedoch aufgrund hoher Standardabweichung keine Signifikanz erreichte. Auch hier konnten keine Unterschiede im Transplantat nachgewiesen werden (Abb. 20).

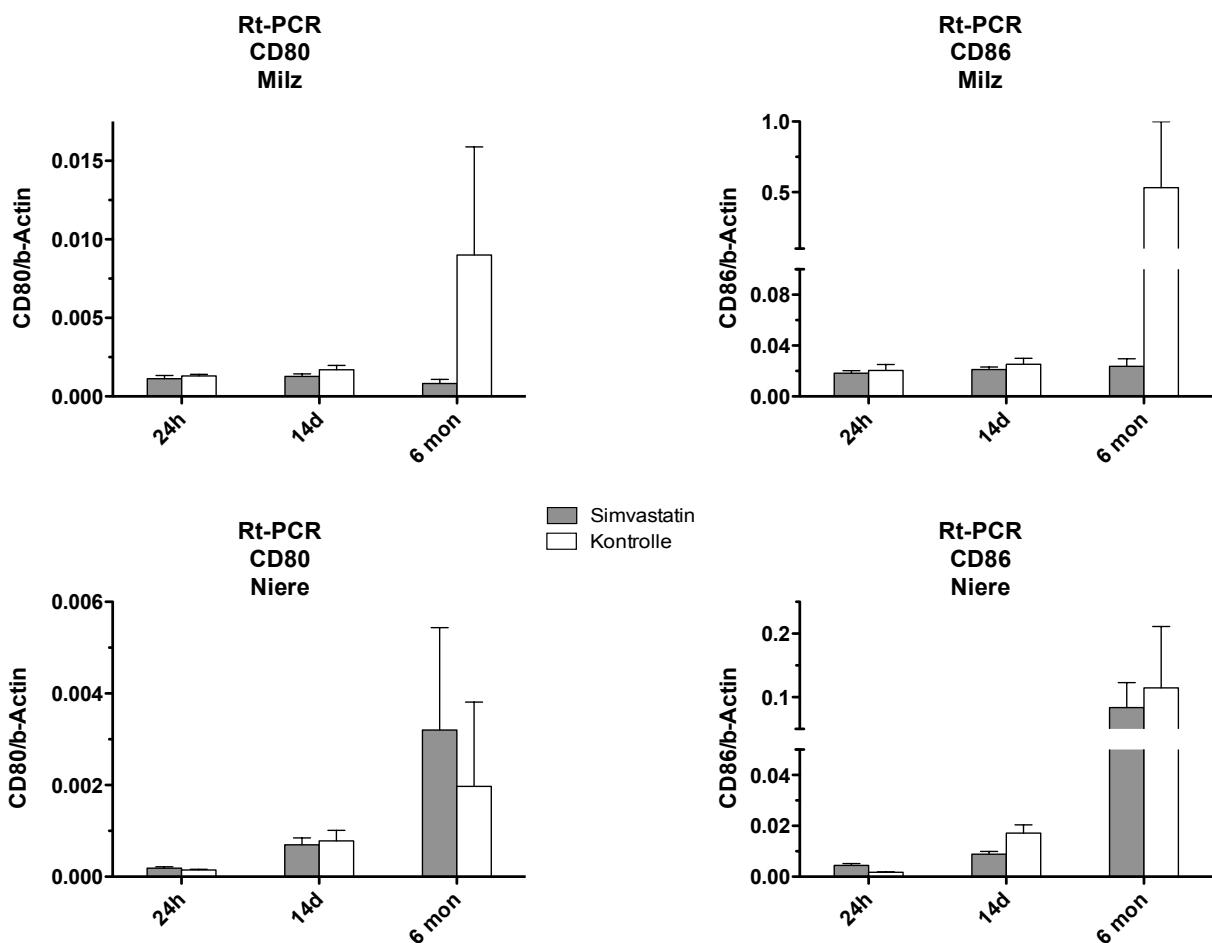


Abb. 20: mRNA Genexpression (rt-PCR) der kostimulatorischen Moleküle, CD80 und CD86. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen vorbehandelten und Kontrolltieren. (n=5 je Behandlungsgruppe und Analysezeitpunkt, t-Test nach Mann-Whitney)

Eine Simvastatinvorbehandlung führt demnach zu einer signifikanten Herunterregulation antigenpräsentierender Zellen mit einer Reduktion von MHC-Klasse-II-Komplexen in der Milz und moderater nicht signifikanter Reduktion der

kostimulatorischen Moleküle. Auch CD3+T-Zellen sind in der rt-PCR nach 24h signifikant reduziert. Im Transplantat konnten weder immunhistochemisch noch in der rt-PCR Veränderungen der transplantat-infiltrierenden-Populationen nachgewiesen werden.

4.3. Genexpression von CCR7, CCL19 und CCL21 in Milz und Transplantat im Kurzzeit- und Langzeitverlauf

T-Zellen exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7, einen Rezeptor für das „secondary lymphoid tissue chemokine“ (SLC) CCL19 und den „Epstein-Barr virus induced receptor ligand chemokine“ (ELC) CCL21. Die T-Zell-Migration wird durch CCL19 (SLC), das von Stromazellen produziert wird, und von CCL21 (ELC), das von dendritischen Zellen und Makrophagen in der T-Zell-Zone der Lymphknoten hergestellt wird, vorangetrieben. CCR7 und seine Liganden CCL19 und CCL21 kontrollieren demnach die Migration von Lymphozyten zum Ort der Inflammation und sind für die Maturation dentritischer Zellen verantwortlich [178]. Da bereits in der Durchflusszytometrie und in der rt-PCR eine Reduktion der APCs, der zur Antigenpräsentation notwendigen Marker und der CD3+ T-Zellen in der Milz unter Simvastatinvorbehandlung gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, inwiefern Mediatoren der dendritischen Zellmigration durch Simvastatin beeinflusst werden. Interessanterweise ließ sich tatsächlich eine signifikante Reduktion des „Homing-Rezeptors CCR7 in der Milz nach 14d ($p= 0,0159$) mit moderaten Herrunterregulationen nach 24h und 6 Monaten in der Milz sowie in der Niere nachweisen. Auch die Chemokine CCL19 und CCL21 weisen eine Minimierung der Genexpression nach 24h und 14d sowie eine signifikante Reduktion nach 6 Monaten ($p=0,0357$ bzw. $p=0,0159$) in der Milz auf (Abb. 21). Somit könnte die Reduktion der APCs in der Milz, die mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde, in erster Linie durch die Simvastatin induzierte Reduktion des Homing-Rezeptors und seiner Liganden zu erklären sein.

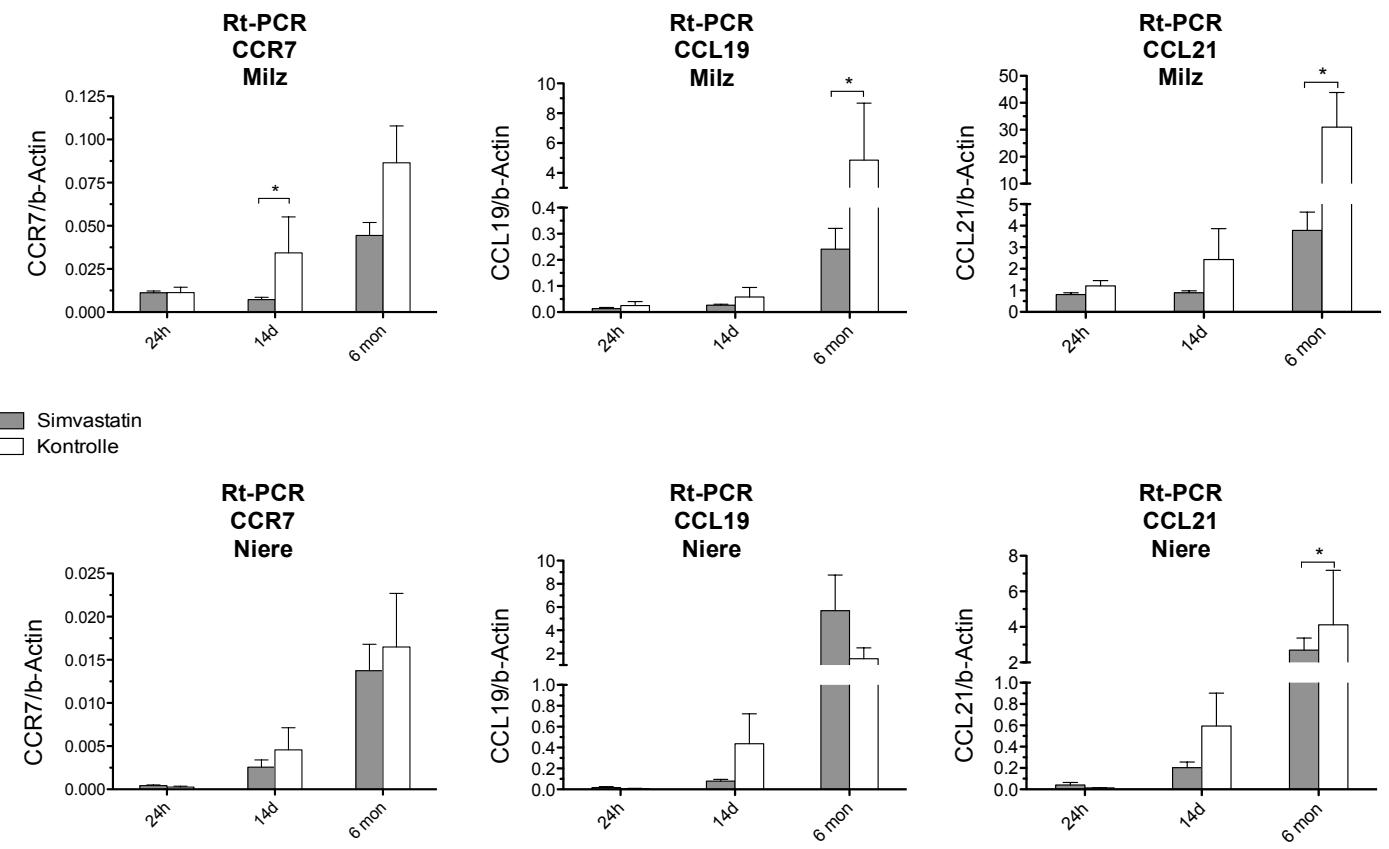


Abb. 21: mRNA Genexpression (rt-PCR) von CCR7 und seinen Liganden CCL19 und CCL21. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von CCR7 nach 14d ($p=0,0159$), von CCL19 nach 6 Monaten ($p=0,0357$) und von CCL21 nach 6 Monaten ($p= 0,0159$) in den Milzen der vorbehandelten Empfängertiere im Vergleich zu den Kontrollen. (n=5 je Behandlungsgruppe und Analysezeitpunkt, t-Test nach Mann-Whitney)

4.4. Genexpression der Immunproteasomuntereinheiten PSMB8, PSMB9, PSMB10

Kotsch et al. zeigten bereits in ihren Arbeiten, dass die Aktivität von Immunproteasomen als Folge des IRS nach verlängerter kalter Ischämie eine Hochregulation erfährt [37]. Diesen multikatalytischen Proteinasekomplexen kommt eine zentrale Rolle in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation, -prozessierung, T-Zellproliferation und Aktivierung zu. Mittels cDNA Microarray Analysen identifizierten Kotsch et al. nach hierarchischer Clusteranalyse neun Gene, die im Rahmen des IRS nach verlängerter kalter Ischämie von 24h versus 20 min. induziert wurden. Unter anderem wurde eine signifikante mRNA Expression der induzierbaren Proteasomen-β-Untereinheiten (Immunproteasomen) PSMB8 (proteasome subunit beta type 8= low molecular mass

polypeptide 7 (LMP7)), PSMB9 (LMP2) und PSMB10 (MECL-1) im renalen Transplantat demonstriert. Die konstitutiv exprimierten Untereinheiten X, Y und Z (PSMB5, PSMB6, PSMB7) zeigten dagegen keine differentielle Genexpression. Mittels Spendervorbehandlung mit CoPP konnte trotz verlängerter kalten Ischämie eine Reduktion der Immunproteasomuntereinheiten in der Milz, nicht jedoch im renalen Transplantat erzielt werden. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse, galt es in der vorliegenden Arbeit zu klären, inwiefern eine Spendervorbehandlung mit Simvastatin zu Veränderungen der Genexpression von PSMB8, PSMB9 und PSMB10 führt.

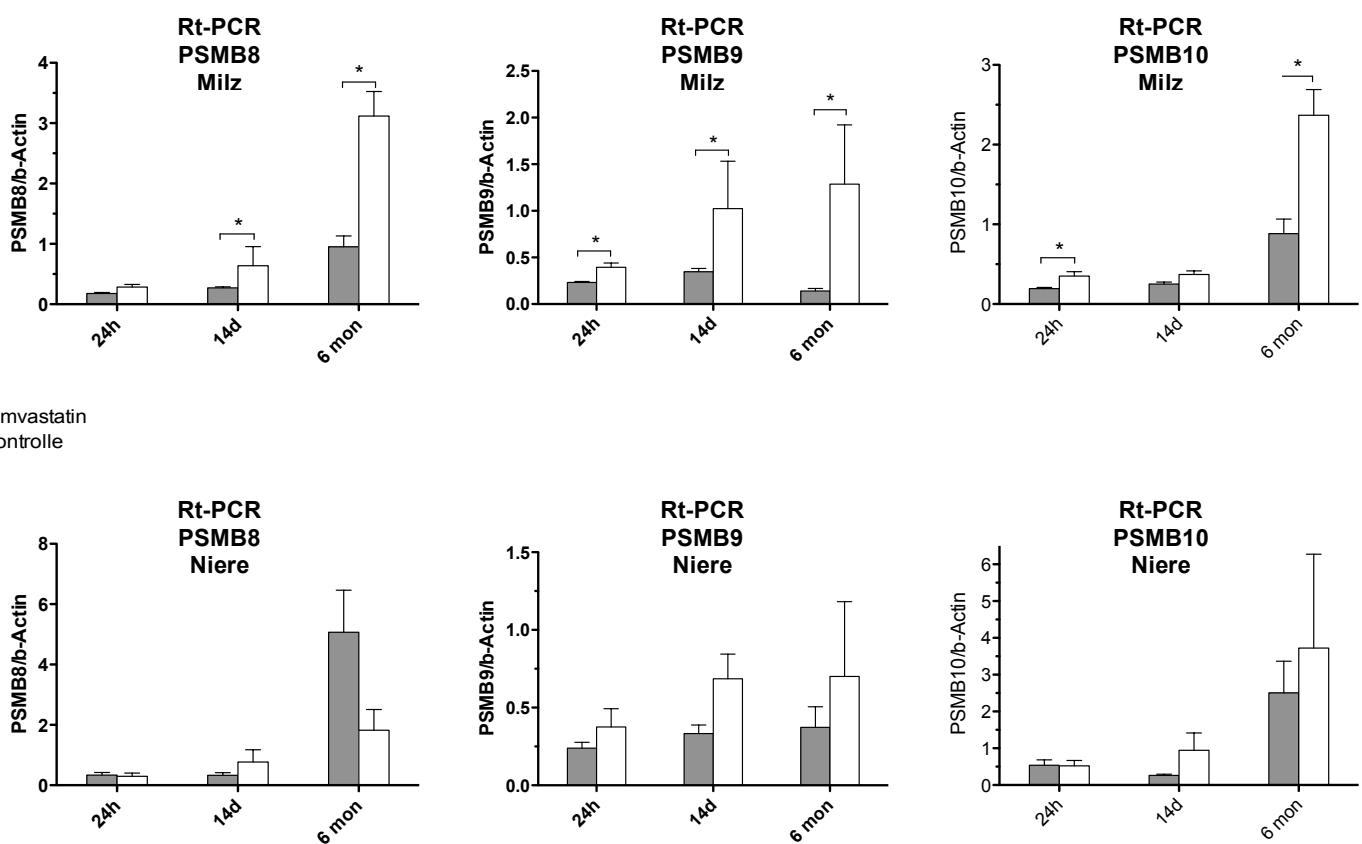


Abb. 22: mRNA-Genexpression (rt-PCR) der Proteasomenuntereinheiten PSMB8, PSMB9 und PSMB10. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion von PSMB 8 nach 14d ($p=0,0286$) und nach 6 Monaten ($p=0,0159$), von PSMB9 nach 24h ($p=0,0159$), nach 14d ($p= 0,0317$), die auch nach 6 Monaten noch nachweisbar ist ($p=0,0159$) sowie von PSMB10 nach 24h ($p=0,0159$) und nach 6 Monaten Follow-up ($p=0,0238$) in der Milz der vorbehandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen. ($n=5$ je Behandlungsgruppe und Analysezeitpunkt, t-Test nach Mann-Whitney)

Tatsächlich resultierte eine Simvastatinbehandlung in einer frühen und signifikanten Reduktion von PSMB9 und PSMB10 nach 24h ($p=0,0159$, $p= 0,0159$) in der Milz, welche auch nach 14d (PSMB9, $p= 0,0317$) und sogar im Langzeitverlauf nach 6

Monaten noch signifikant nachweisbar blieb (PSMB9 und PSMB10, $p=0,0159$ und $0,0238$), Abb. 22. Auch die PSMB8-Expression zeigte sich nach 14d ($p= 0,0286$) und ebenfalls nach 6 Monaten ($p= 0,0159$) signifikant reduziert. Analog zu den Ergebnissen von Kotsch et al. sind diese Effekte auf die Milz beschränkt und im renalen Transplantat nicht oder nur moderat zu erkennen. Bemerkenswerterweise scheint die Reduktion der Proteasomenuntereinheiten jedoch in der vorliegenden Arbeit unabhängig von dem Hämoxigenasesystem zu erfolgen, dessen Induktion im Spender wie bereits erläutert nicht nachgewiesen werden konnte.

4.5. Genexpression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, antiapoptotischen Markern im Kurz- und Langzeitverlauf nach Simvastatinvorbehandlung

Der IRS resultiert in der Aktivierung von multiplen Immunprozessen. So führt die Freisetzung freier Radikaler zu einer Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen, die ihrerseits proinflammatorische Zytokine wie u.a. TNF α , IL-12 oder auch IFN γ freisetzen. Auch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 durch aktivierte Endothelzellen spielt in diesem Zusammenhang eine Rolle und geht mit einer verstärkten Leukozyten-Endothel-Adhäsion mit Infiltration der Leukozyten in das umliegende Gewebe einher, welche ihrerseits durch Freisetzung von freien Radikalen, Leukotrienen und Zytokine, die lokale Entzündungsreaktion ankurbeln [16]. IL-12 ist ein Heterodimer, das aus den zwei Untereinheiten p40 und p35 besteht. Im Jahre 2000 konstatierten Oppmann et al., dass die Interleukine IL-12 und IL-23, welche die Th-1 bzw. die Th-17 Differenzierung initiieren, durch die gemeinsame p40 Untereinheit gekennzeichnet sind [179]. Zusammen mit der Untereinheit p35 bildet p40 das Interleukin IL-12, kommt es jedoch zu Ausbildung eines Heterodimers zwischen p40 und p19 wird das Interleukin IL-23 gebildet, welches stabilisierende Effekt auf sich differenzierende Th17-Zellen ausübt [180]. Eine Depletion der p40 Untereinheit würde somit zu einer Reduktion sowohl einer Th-1 als auch einer Th-17 vermittelten Immunantwort führen [180, 181]. Die proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α führen zur Hochregulation einer Reihe von inflammatorischen Markern, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen sowie zur Initiierung einer Th-1 vermittelten Immunreaktion [182]. Ziel durch Bestimmung der Genexpression von IL-12p40, IFN γ und TNF α war es, den Einfluss einer Simvastatinvorbehandlung auf die Th-1 Immunantwort zu

untersuchen. Abb. 23 demonstriert jedoch, dass die Spendenvorbehandlung mit Simvastatin weder in der Milz noch im Transplantat zu Unterschieden in der Genexpression der mit der Th-1 Immunantwort assoziierten Zytokine führt.

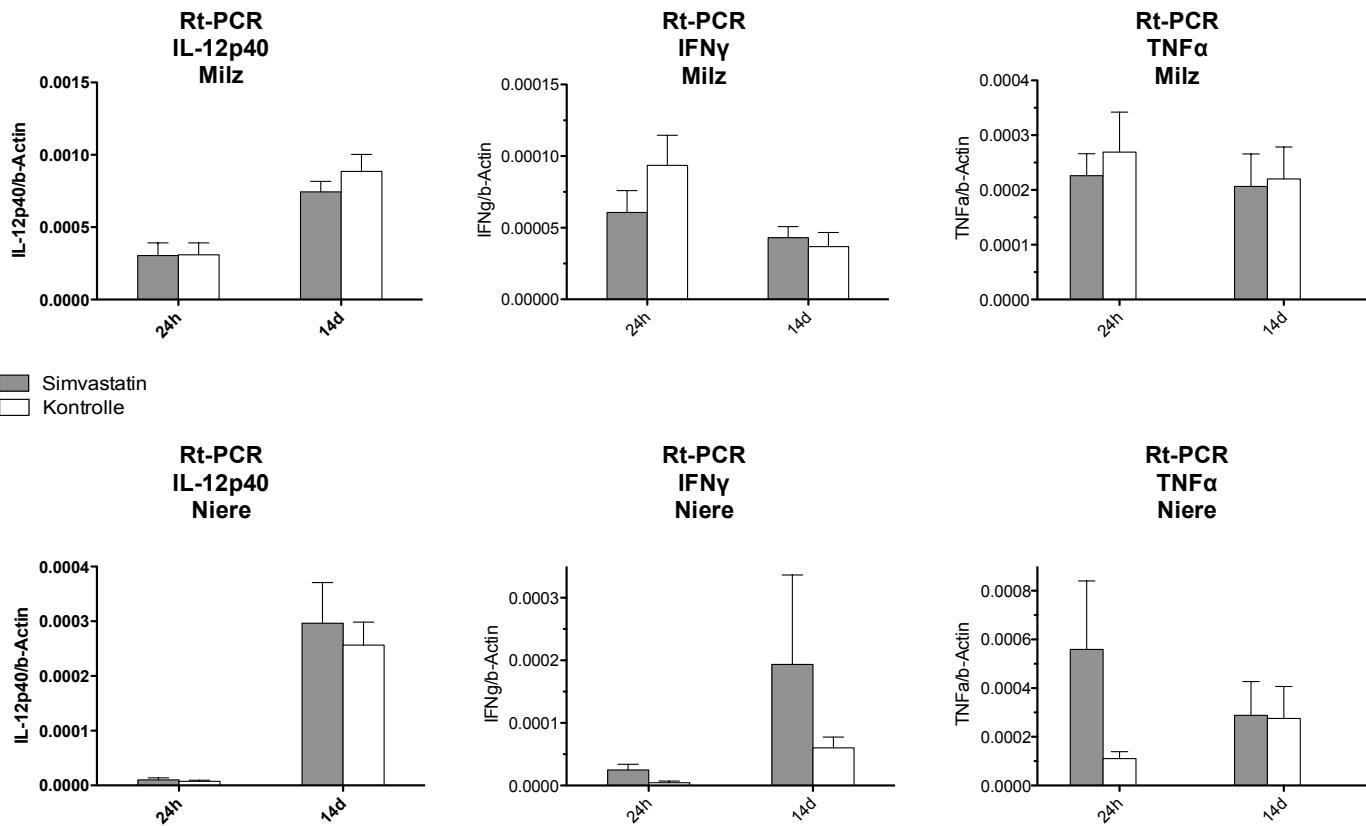


Abb. 23: mRNA-Genexpression (rt-PCR) von IL-12p40, IFNγ und TNFα. Es zeigten sich weder in der Milz noch im Allograft signifikante Veränderungen dieser Marker. (n=5 je Behandlungsgruppe und Analysezeitpunkt, t-Test nach Mann-Whitney)

Auch das Adhäsionsmolekül ICAM-1 zeigte interessanterweise keine Veränderungen in seiner Genexpression in Milz und Transplantat zwischen vorbehandelten und Kontrolltieren, Abb. 24.

Obwohl der durch die direkte und indirekten Prozesse des IRS ausgelöste Zelltod vornehmlich durch Nekrose erfolgt, kann eine Freisetzung von proapoptotischen Mediatoren durch die Mitochondrien zum Teil auch zur Apoptose der Zellen im Rahmen des IRS führen [22].

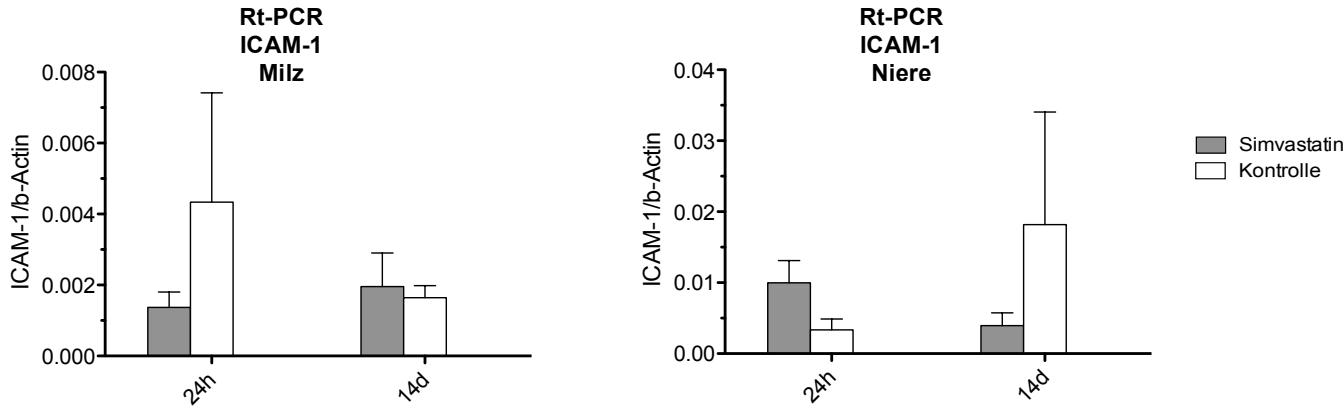


Abb. 24: mRNA-Genexpression (rt-PCR) von ICAM-1 zeigte keine signifikanten Veränderungen in der Milz und im Allograft zwischen vorbehandelter und Kontrollgruppe. (n=5 je Behandlungsgruppe und Analysezeitpunkt, t-Test nach Mann-Whitney)

Darüberhinaus werden die antiapoptotischen Effekte der Statine als eine der vielen pleiotropen Effekte dieser Substanzgruppe beschrieben [152]. Dennoch demonstriert Abb. 25, dass eine Spendervorbehandlung mit Simvastatin keine Induktion der antiapoptotischen Marker Bag-1 oder Bcl-2 zur Folge hat.

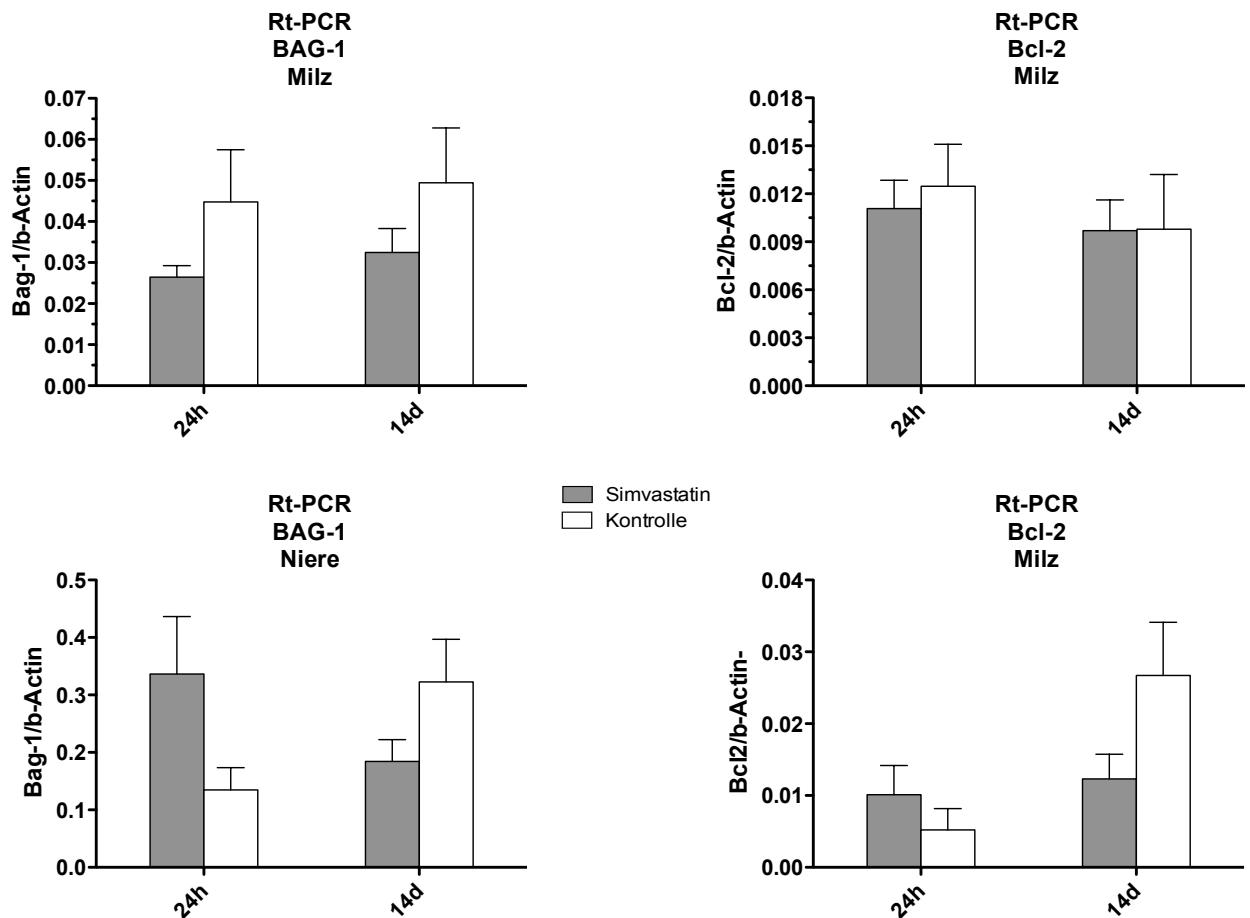


Abb. 25: mRNA-Genexpression (rt-PCR) von BAG-1 und Bcl-2 zeigten weder in der Milz noch im Allograft signifikante Veränderungen zwischen der mit Simvastatin vorbehandelten Gruppe und den Kontrolltieren. (n=5 je Behandlungsgruppe und Analysezeitpunkt, t-Test nach Mann-Whitney)

4.6. Nierenfunktion im Langzeitverlauf

Nachdem die Beeinflussung einer Donorvorbehandlung mit Simvastatin immunhistochemisch, durchflusszytometrisch und auf PCR-Ebene untersucht wurden, stellte sich nun die Frage nach der Veränderung der Nierenfunktionswerte im Langzeitverlauf. Zu den diagnostischen Methoden zur Beurteilung der Nierenfunktion gehört als wichtigster Test die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Hierfür wird die Clearance von Kreatinin gemessen, welches glomerulär filtriert, tubulär aber nur geringfügig rückresorbiert wird. Der Bedeutung dieser Methode liegt in ihrer hohen Sensitivität, da bereits leichte Einschränkungen der Nierenfunktion erkannt werden können, die von anderen Tests noch nicht erfasst werden. Ein Anstieg der im Urin ausgeschiedenen Proteine lässt ebenfalls Rückschlüsse auf die Nierenfunktion zu. Im Ultrafiltrat gesunder Nieren erscheinen nur niedermolekulare Proteine, die zu 90% im proximalen Tubulus rückresorbiert werden. Unter Proteinurie versteht man beim Menschen die Ausscheidung von >150mg Eiweis/24h. Ein Anstieg der harnpflichtigen Substanzen ist ein relativ später Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion und setzt erst ein, wenn eine deutliche funktionelle Beeinträchtigung besteht. Abb. 26 demonstriert die GFR, die Proteinkonzentration im Urin und die Harnstoffkonzentration im Serum an Tag 50 (GFR und Harnstoff) und an Tag 90 (GFR, Proteinkonzentration, Harnstoffkonzentration) nach NTx. Die Analyse der Funktionswerte erreicht keine statistische Signifikanz, dennoch lässt sich die Tendenz einer geringfügig höheren GFR mit konsekutiv niedrigerer Serum-Harnstoffkonzentration an Tag 50 und 90 in den mit Simvastatin vorbehandelten Tieren erkennen. Dies geht einher mit einer minimal erniedrigte Proteinkonzentration im Urin der vorbehandelten Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren.

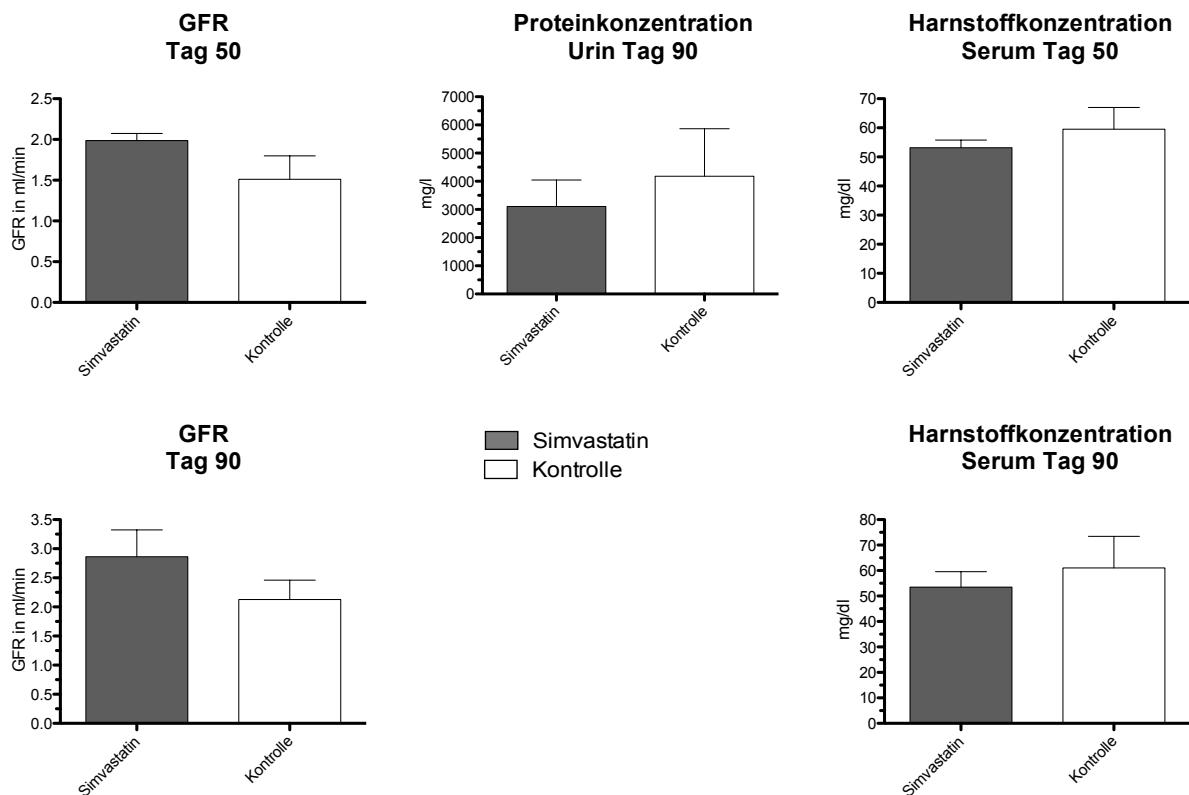


Abb. 26: Darstellung der Nierenfunktionsparameter im Langzeitverlauf nach Tag 50 und Tag 90. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Es lässt sich jedoch eine tendenziell bessere Nierenfunktion durch Reduktion der GFR nach 50 und 90 Tagen, sowie geringere Proteinkonzentration im Urin und Harnstoffkonzentration im Serum demonstrieren. (n=5 je Behandlungsgruppe, t-Test nach Mann-Whitney)

4.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass wir die protektiven Wirkungen einer Statinvorbehandlung nicht auf das Hämpxygenasesystem zurückführen konnten, da sich zwischen vorbehandelten und Kontrolltieren keine Unterschiede in der HO-1 Expression nachweisen ließen (Kapitel 4.1). Vielmehr wurde durch die Spendervorbehandlung mit Simvastatin eine Reduktion der Migration antigenpräsentierender Zellen in die SLO erzielt, welche sich sowohl durchflusszytometrisch in der Reduktion von APCs in den Milzen der Empfänger, als auch in der herabgesetzten Expression der die Migration vermittelnden Rezeptoren und Liganden (CCR7, CCL19, CCL21) niederschlug und schließlich mit einer konsekutiv verminderten Aktivierung des adaptiven Immunsystems assoziiert war (Reduktion von MHC-Klasse-II und des T-Zellmarkers CD3) (Kapitel 4.2 und 4.3). Die im Rahmen des

IRS hochregulierten inflammatorischen Zytokine (TNF α , IFN γ , IL-12p40) und Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) andererseits zeigten unter der Vorbehandlung keinerlei Unterschiede in ihrer Expression. Auch die antiapoptotischen Marker Bcl-2 und BAG-1, welche in kardialen Modellen unter Statintherapie eine Hochregulation zeigten [152], unterlagen keinen Veränderungen.

Neben der modulatorischen Wirkung auf die Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung scheint die Statinvorbehandlung auch die Antigenprozessierung durch Reduktion der Genexpression der Immunproteasomuntereinheiten PSMB8, PSMB9 und PSMB10, welchen insbesondere im Kontext des IRS eine zentrale Rolle zukommt [37], zu beeinflussen (Kapitel 4.4). In Zusammenschau führen die beschriebenen Effekte zu einer verminderten Immunogenität des Transplantats sowie zu einer reduzierten Alloreaktivität des Empfängerorganismus und vermitteln somit immunsuppressive Effekte. Diese Beobachtungen werden durch die Analyse der Nierenfunktionswerte im Langzeitverlauf unterstützt, welche, wenn auch nur tendenziell, auf eine bessere Nierenfunktion unter Spendervorbehandlung mit Simvastatin hindeutet.

Diskussion

Verzögerte Funktionsaufnahme von renalen Transplantaten (DGF) und chronische Allograftnephropathie (CAN) bzw. –dysfunktion (CAD) stellen nach wie vor Hürden der Transplantationsmedizin dar [50, 51] und limitieren das Langzeit-Outcome nach Organtransplantation. Als alloantigenunabhängige Risikofaktoren wurde neben Spenderalter, Organqualität, Hirntod und arterieller Hypertonie, der IRS identifiziert, der durch einerseits direkt toxische Effekte aber auch durch Induktion alloantigen-spezifischer Prozesse das Transplantat zusätzlich schädigt. Bemerkenswerterweise ist es trotz intensiven Studiums von Strategien und Substanzen zur Beeinflussung des IRS nicht gelungen, diese tatsächlich in die klinische Anwendung einzuführen [53, 58, 67, 133]. Die meisten dieser Ansätze zielen auf die Reduktion des oxidativen Stresses durch Applikation von antioxidativ wirkenden Agentien. Doch auch die antiinflammatorische Spendervorbehandlung durch Immunsuppressiva, Zytostatika, Zelltransfer (Stammzellen, Splenozyten etc), ischämische Präkonditionierung, Gentherapien oder Radiatio zur Depletion von Spender-DCs wurden vielfach beschrieben und untersucht [183-185]. Es liegt jedoch nahe, dass die Maßnahmen zur Reduktion des IRS vor dessen klinischer Manifestation eingeleitet werden sollten, so dass somit die Vorbehandlung des Organspenders die Therapieoption der Wahl zu sein scheint. Im Hinblick auf zytoprotektive Wirkungen stellte sich die Induktion der HO-1 im experimentellen Modell als wirksame Strategie zur Minimierung des IRS heraus [118, 124, 186]. Nachdem Lee et al. in vitro und in vivo eine HO-1 Induktion durch einmalige Simvastatinbehandlung zeigen konnten, stellt sich die Frage, welche Auswirkungen diese Substanzklasse auf den IRS besitzt. Zudem sind als pleiotrope Effekte der Statine auch antiapoptotische und antiinflammatorisch bzw. immunmodulatorische Eigenschaften wie Reduktion proinflammatorischer Zytokine [86, 134, 187] beschrieben, diese jedoch bislang nicht im Kontext kalter Ischämie nachgewiesen. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer Spendervorbehandlung mit Simvastatin auf die Mechanismen des IRS im Kurz- und Langzeitverlauf zu untersuchen.

5.1. Spendervorbehandlung mit Simvastatin führt nicht zur Induktion der HO-1 im Spender

Mit Einsetzen der Hypoxie wird eine Kaskade von Prozessen ausgelöst, die über die Funktionsseinstellung ATP-abhängiger Ionentransporter zu einem vermehrten, intrazellulären Calciumeinstrom mit konsekutiver Aktivierung von Proteasen und Phospholipasen führt, die einerseits Mitochondrien schädigen und bis hin zur Zellyse führen sowie andererseits zu einer Konversion der Xanthinhydrogenase zur Xanthinoxidase führt. Während der sich nun anschließenden Reperfusion und dem wiederhergestelltem Sauerstoffangebot kommt es in Anwesenheit der Xanthinoxidase zur Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen [63]. Weitere Quellen für reaktive Sauerstoffspezies stellen die geschädigten Mitochondrien bzw. die mit der einhergehenden Inflammation infiltrierenden neutrophilen Granulozyten dar [16]. Aufgrund der antiapoptotischen und antioxidativen Eigenschaften zählt die induzierbare HO-1 zu den wichtigsten protektiven Proteinen des Organismus. Diese Eigenschaften werden einerseits direkt über den Abbau des zytotoxischen Häms sowie andererseits über die Abbauprodukte Bilirubin-/verdin, CO und Eisen vermittelt. Schließlich soll HO-1 durch Translokation in den Nukleus auch auf Transkriptionsebene die Expression weiterer zytoprotektiv wirkender Gene initiieren [107]. Eine Induktion dieses Gens stellt somit einen interessanten therapeutischen Ansatz zur Reduktion des IRS dar. Grosser et al. [142] wiesen 2004 nach 8h Inkubation von Endothelzellen mit 100µmol/l Simvastatin oder in einem zweiten Experiment mit 300 µmol/l Lovastatin eine Hochregulation der HO-1-mRNA nach, die 3h nach der Exposition begann und nach 12h ihr Maximum erreichte. Sie konnten zeigen, dass die Statin vermittelte HO-1 Induktion unabhängig von den Transkriptionsfaktoren NFKB und Nrf2 über DNA Sequenzen der proximalen HO-1-Promotorregion des Gens reguliert wird. Wenige Monate später berichteten sie von den gleichen induktiven Effekten durch Rosuvastatin [143]. Kurze Zeit später behandelten Lee et al. [144] zunächst *in vitro* humane und murine VSMC mit unterschiedlichen Konzentrationen von Simvastatin für 24h und fanden eine dosisabhängige Induktion der HO-1 in diesen Zellen vor. Auch hier wurde der Anstieg nach 3h beobachtet und war auch 24h nach der Exposition noch nachweisbar. Im zweiten Schritt testeten sie die HO-1 Antwort *in vivo*, indem sie bei C57BL/6J Mäusen eine einmalige Dosis von 5mg/kg Simvastatin intraperitoneal applizierten. Auch hier stellte sich das Maximum der Induktion nach 12h ein, blieb

jedoch auch nach 24h noch deutlich erhöht. Auch mit niedrigeren Dosierungen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Immunhistochemisch ließ sich die HO-1 vor allem in der Tunica media der VSMCs, in Hepatozyten und Kardiomyozyten, nicht jedoch in renalen und pulmonalen parenchymalen Zellen nachweisen. Trotz Verwendung einer höheren Dosis und längerem Behandlungszeitraum als Lee et al. konnten wie diesen Effekt nicht bestätigen. Wir untersuchten mittels rt-PCR Leber, Milz und kontralaterale Niere des Spenders auf HO-1 mRNA Expression. Lee und Kollegen hatten in ihren Experimenten die HO-1 Expression in der Milz nicht untersucht und im Nierenparenchym war auch in ihrer Studie keine Induktion erkennbar. Doch obwohl sie eine Induktion in den Hepatozyten ihrer behandelten Mäuse zeigten, fanden wir wie Abb. 13 demonstriert, keine Hochregulation von HO-1 in den Lebern der Spendertiere. In Zusammenschau unserer Ergebnisse führen wir die protektiven Effekte einer Vorbehandlung mit Simvastatin somit nicht auf die Induktion der HO-1 zurück. Möglicherweise wird eine Induktion des Enzyms vornehmlich in VSCM erreicht und durch unsere Analyse des gesamten Organs (Leber, Milz, Niere) samt Parenchymzellen fällt der Effekt einer Induktion durch VSMC nur sehr gering ins Gewicht. Andererseits beschrieb Lee eine Hochregulation auch in Hepatozyten, die wir in unserer Arbeit nicht nachvollziehen konnten.

5.2. Simvastatin Vorbehandlung beeinflusst die DC-Migration in SLO, die Antigenprozessierung und –präsentation sowie die T-Zell-Aktivierung

Neben den direkten Schädigungen, die die Freisetzung von Sauerstoffradikalen zur Folge hat, kommt es durch Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8 oder TNF α , IFN γ [18], sowie eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie Selektinen und ICAM-1, die eine verstärkte Leukozyten-Endothelzell-Adhäsion und damit die leukozytäre Infiltration zum Ort der Inflammation oder auch den leukozytären Eintritt in die subkapsulären Sinus der Lymphknoten ermöglicht. Weiterhin ist in den letzten Jahren die Bedeutung der angeborenen Immunität im Kontext des IRS evident geworden. So konnte gezeigt werden, dass der Gewebeschaden im Rahmen des IRS zu einer Hochregulation der Toll-like Rezeptoren (TLR) führt, welche ihrerseits die Aktivierung und Reifung spender-spezifischer dendritischer Zellen initiieren. Unreife DCs zeichnen

sich durch die Expression der inflammatorischen Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR1 aus. Während ihrer Reifung kommt es zu einem Shift der Rezeptorexpression in Richtung CCR4, CXCR4 und CCR7, der ihnen die Migration in die sekundär lymphatischen Organe (SLO) des Empfängers zur T-Zell-Aktivierung ermöglicht [23]. Da naive T-Zellen ebenfalls CCR7 exprimieren, gelangen auch sie über die Bindung an den CCR7 Liganden CCL21, welcher auf den endothelialen Zellen lymphatischer Gefäße (high endothelial venules= HEV) ausgebildet wird, in die Lymphknoten. Die T-Zellmigration wird einerseits von CCL21 vorangetrieben, sowie andererseits von CCL19, das von DCs und Makrophagen in der T-Zell-Zone des Lymphknotens hergestellt wird. Dort kommt es zu Stimulation der naiven T-Zellen und Initiierung der adaptiven Immunantwort. Die TLR vermittelte Reifung der DCs führt außerdem zu einer Induktion der MHC-Klasse-I und -II und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 [23, 24], die für die DC-T-Zell-Interaktion benötigt werden. Loi et al. isolierten DCs aus reperfundierte Leberallografts und wiesen deren reifen Phänotypen mit erhöhter Expression von MHC-Klasse-II und kostimulatorischen Molekülen nach [35]. Für die Initiierung der adaptiven Immunantwort sind beide Signale notwendig: die Antigenpräsentation durch MHC-Komplexe auf den DCs sowie die Bindung ihrer kostimulatorischen Moleküle CD80/86 an das auf den T-Zellen exprimierte CD28. Die Blockade dieses kostimulatorischen Signals ist die Grundlage der Therapie mit dem Fusionsprotein CTLA4-Ig (Belatacept), welches in der Klinik bereits Anwendung findet [177]. Die Aktivierung und Migration donorspezifischer DCs in regionale Lymphknoten und in die Empfängermilz stimuliert dementsprechend durch die beschriebenen Mechanismen eine klonale Expansion alloreaktiver T-Zellen. Martins et al. demonstrierten durch HO-1 Induktion mittels Spenderbehandlung mit CoPP in einem Nierentransplantationsmodell der Ratte, dass es zu einer Reduktion dieser spenderspezifischen DCs sowohl im Transplantat als auch in der Peripherie kam [87]. Nun ließ sich in der vorliegenden Arbeit zwar keine HO-1 Induktion durch Simvastatin Vorbehandlung beobachtet werden, durchflusszytometrisch zeigte sich interessanterweise dennoch eine signifikante Reduktion der Gesamtheit der CD4+ Zellen in den Empfängermilzen der vorbehandelten Tieren sowohl nach 24h als auch nach 14 Tagen. Nach genauerer Phänotypisierung dieser Zellen wurde deutlich, dass es sich hierbei nicht um eine Reduktion CD4+ T-Helferzellen sondern um CD3-CD4+ Monozyten handelte, siehe Abb. 16. Des Weiteren ließ sich auf PCR-Ebene zunächst eine moderate Reduktion von CCR7 nach 24h nachweisen, welche nach 14d

statistische Signifikanz erreichte und auch nach 6-monatigem Follow-up noch erhalten blieb. Auch die Liganden CCL19 und CCL21 zeigten eine signifikante Herunterregulation im Langzeitverlauf unter Simvastatin Vorbehandlung. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und PCR verdeutlichen damit, dass eine Spendervorbehandlung mit Simvastatin offensichtlich zu einer Reduktion antigenpräsentierender Zellen führt und durch Reduktion von CCR7 und seiner Liganden die Migration dieser Zellen in sekundär lymphatische Organe verringert. Auch Haylor et al. demonstrierten in ihrem warmen Ischämiemodell, dass eine Statinbehandlung zu einer Reduktion ED-1+ Makrophagen und Monozyten führte. Diese Beobachtung beschrieb die Autoren allerdings anhand der histologischen Färbungen der Nieren [69]. Histologisch ließ sich in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied zwischen vorbehandelten Tieren und der Kontrollgruppe zeigen und auch auf PCR-Ebene sind die beobachteten Effekte nur in der Empfängermilz und nicht im Transplantat nachweisbar. Die Diskrepanz zu der Arbeit von Haylor et al. liegt möglicherweise an der mangelnden Vergleichbarkeit eines kalten mit einem warmen Ischämiemodell. Dennoch demonstrieren beide Studien eine Reduktion antigenpräsentierender Zellen im Kontext mit Statin-Vorbehandlung. Die Konsequenz könnte eine verminderte Aktivierung der adaptiven Immunantwort bedeuten, so dass wir die mRNA-Expression des T-Zellmakers CD3 untersuchten. Interessanterweise zeigte sich bereits nach 24h eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von CD3 in den Empfängermilzen (Abb. 19).

Als nächsten Bestandteil der APC-T-Zell-Interaktion untersuchten wir die Genexpression von MHC-Klasse-II und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Letztere wiesen zu allen Zeitpunkten nur nicht signifikante milde Herunterregulationen unter Simvastatin Vorbehandlung im Vergleich zu den Kontrollen auf. MHC-Klasse-II dagegen, zunächst ebenfalls nur moderat reduziert nach 24h und 14d, wies eine signifikante Reduktion nach 6 Monaten Follow-up (Abb. 19) auf. Somit lässt sich festhalten, dass Simvastatin den gesamten Mechanismus von der Migration antigenpräsentierender Zellen bis hin zur T-Zell-Aktivierung beeinflusst. Die beobachteten Effekte waren jedoch ausschließlich auf die sekundär lymphatischen Organe beschränkt. In dem Kontext der Aktivierung des adaptiven Immunsystems wurde auch die mRNA Expression der Th1- und Th-17 Antwort stimulierenden p40 Untereinheit des Interleukins IL-12 sowie das Th-1 Effektorzytokin IFN γ untersucht. Es zeigten sich weder in der Milz noch im Transplantat Unterschiede in der Genexpression

nach 24h oder 14d zwischen vorbehandelter und Kontrollgruppe. Gleiches galt für die Genexpression des inflammatorischen Mediators TNF α (Abb. 23). Auch die Messung der Genexpression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 sowie der antiapoptotischen Marker BAG-1 und Bcl-2 erbrachten lediglich geringfügige Reduktionen der Expression in der Milz nach 24h und 14d nach Spendervorbehandlung (Abb. 24 und 25).

Neben Stimulation einer T-Helferzell-Antwort durch T-Zell-Interaktion über MHC-Klasse-II und kostimulativer Bindung mit APCs, führt eine Antigenpräsentation über MHC Klasse I zu einer Aktivierung CD8+ zytotoxischer T-Zellen, deren Beteiligung an Abstoßungsprozessen unbestritten, die genauen Mechanismen jedoch noch nicht eindeutig geklärt sind [188]. Durchflusszytometrisch ließ sich keine Reduktion CD3+CD4- Zellen (CD8+ T-Zellen weitestgehend entsprechend) nach Simvastatinvorbehandlung nachweisen (Abb. 17). Interessanterweise zeigte sich jedoch eine drastische Reduktion der zur Antigenprozessierung notwendigen Immunproteasomenuntereinheiten PSMB8, PSMB9 und PSMB10 zu allen Zeitpunkten nach Spendervorbehandlung (Abb. 22). Wie bereits erläutert, sind diese multikatalytischen Proteasen für die nicht lysosomale Proteindegredation in eukaryotischen Zellen verantwortlich [189] und spielen eine zentrale Rolle in der Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle [38]. Neben der Antigenpräsentation über Spender-DCs und den MHC-Klasse-II-Signalweg wird in den letzten Jahren die sogenannte „cross-presentation“ und das „cross-priming“ diskutiert [190-192]. Dies beschreibt, dass sowohl Spender- vor allem aber auch Empfänger-DCs die Möglichkeit besitzen, durch „cross-presentation“ exogene Antigene aufzunehmen und diese über MHC-Klasse-I-Moleküle naiven CD8+ T-Zellen zu präsentieren und diese so zu stimulieren (cross-priming) [190]. So würde es neben dem direkten Spender-DC-MHC-Klasse-II-Signalweg mit Aktivierung einer T-Helferzellantwort auch zu einer indirekten über einen Spender- oder Empfänger-DCs-MHC-Klasse-I-Signalweg zu einer Aktivierung von CD8+T-Zellen kommen [190]. Um eine Präsentation exogener Antigene über MHC-Klasse-I zu ermöglichen, müssen die aufgenommenen Antigene vorher über Proteasomen prozessiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass unreife DCs einen Basis-Level an Immunproteasomen exprimieren, die Synthese aber während ihrer Reifung hochregulieren [193]. Auch eine direkte Induktion der Immunproteasomen über TLR wird beschrieben [194]. Kotsch et al. beobachteten in einem cDNA Microarray Experiment, dass es im Rahmen des IRS zu einer signifikanten Induktion der Immunproteasomenuntereinheiten im Transplantat kam. Eine Vorbehandlung des

Spenders mit CoPP führte aber zu einer signifikanten Reduktion dieser Untereinheiten in der Empfängermilz [37]. Angesichts der Hochregulation der Immunproteasomenuntereinheiten, die die Autoren im Zusammenhang mit verlängerter kalter Ischämie beschrieben und der Reduktion durch Spendervorbehandlung mit CoPP, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Simvastatin Vorbehandlung auf die Expression der Immunproteasomenuntereinheiten untersucht. Tatsächlich ließen sich die deutlichsten Effekte in der Genexpression von PSMB8, PSMB9 und PSMB10 unter Simvastatinvorbehandlung demonstrieren. Es zeigten sich signifikante Reduktionen der Untereinheiten bereits nach 24h in der Milz der vorbehandelten Tiere, die auch nach 14d und sogar nach 6 Monaten noch signifikant nachweisbar blieben. Interessanterweise, doch die Beobachtungen von Kotsch et al nach CoPP Vorbehandlung bestätigend, ließen sich nur moderate Reduktionen der Genexpression von PSMB9 und PSMB10 im renalen Allorgaft erkennen (Abb. 22).

Zusammenfassend konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass eine verlängerte kalte Ischämie zu einer Induktion der Immunproteasomuntereinheiten PSMB8, PSMB9 und PSMB10 führt, welche in einer effizienteren Generation von allogenetischen T-Zell-Epitopen, die durch CD8+T-Zellen präsentiert werden, resultiert. Pye et al demonstrieren 2002 [195] dass die Applikation von Proteasomeninhibitoren die Auswirkungen des IRS im Herzinfarktmodell des Schweins deutlich vermindern konnten. In der vorliegenden Arbeit konnte ein inhibitorischer Effekt auf die Synthese der Immunproteasomenuntereinheiten durch Spendervorbehandlung mit Simvastatin demonstriert werden, die offensichtlich HO-1-unabhängig erfolgt.

Es lässt sich also festhalten, dass diese Vorbehandlung zu einer Beeinflussung der Migration antigenpräsentierender Zellen in die Empfängermilz (Reduktion der Monozyten in der Milz, Reduktion von CCR7, CCL19 und CCL21), der Antigenpräsentation (Reduktion von MHC-Klasse-II, moderate Reduktion der kostimulatorischen Moleküle) selbst und der T-Zell-Aktivierung (Reduktion der mRNA Expression des T-Zellmarkers CD3) nicht nur über den direkten Weg, sondern auch über eine Reduktion der Antigenprozessierung (Reduktion der Immunproteasomenuntereinheiten) und damit in letzte Konsequenz zu einer verminderten „cross-presentation“ und Aktivierung von CD8+ T-Zellen führt.

6. Ausblick: Simvastatin als Spendervorbehandlung

Statine sind fester Bestandteil der kardioprotektiven Therapie zur Senkung kardiovaskulärer Mortalität und Morbidität bei Patienten mit manifester atherosklerotischer Herzerkrankung oder Diabetes mellitus, deren Cholesterinwerte normal oder erhöht sind. Terminal niereninsuffiziente Patienten besitzen ein signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse. Daher ist eine bereits laufende Statintherapie bei transplantelisteden Patienten nicht selten der Fall. Das Nebenwirkungsprofil dieser Medikamente ist verhältnismäßig gering. Die Häufigkeit einer Myopathie wird unter der Standarddosis (zum Beispiel 20 bis 40 mg Simvastatin) mit 1 zu 10.000 vom Hersteller selbst angegeben (Fa. Merck). Sie verlaufen zumeist mild und gehen nur sehr selten in eine Rhabdomyolyse über. Dennoch kann es bei multimorbidien Patienten mit ausgedehnter Hausmedikation zu Arzneimittelinteraktion kommen. Simvastatin wird über das Cytochrom-System in der Leber abgebaut. Es ist ein Substrat für das Enzym Cytochrom P4503A4. Potente Inhibitoren des Cytochromsystems erhöhen das Risiko einer Myopathie/Rhabdomyolyse durch die Erhöhung der Konzentration der inhibitorischen Aktivität der HMG-CoA Reduktase im Plasma während der Therapie mit Simvastatin (Arzneimittelnebenwirkungen, -interaktionen, Fa. Merck). Abb. 27, ebenfalls von Fa. Merck zur Verfügung gestellt, listet Arzneimittel auf, die vollständig oder teilweise die CYP3A4 inhibieren. Bei Ciclosporin ist der genaue Interaktionsmechanismus nicht geklärt, dennoch beschreiben Fallberichte das Auftreten von Rhabdomyolyse in nierentransplantierten Patienten unter der gleichzeitigen Therapie mit Ciclosporin und Simvastatin [196]. Daher wird eine laufende Statintherapie posttransplantationem bei Immunsuppression mit Calcineurin-Inhibitoren häufig beendet oder pausiert. Die Therapie eines Nierentransplantatempfängers mit HMG-Co-A-Reduktase-Hemmern sollte daher nur unter strenger Indikationsstellung und genauer Prüfung des Interaktionspotenzials mit der Komedikation erfolgen. In der vorliegenden Arbeit prüften wir jedoch die Auswirkung einer Spendervorbehandlung mit dieser Substanzklasse. Dass Statine neben der Cholesterinsenkung noch weitere, pleiotrope Effekte besitzen, wurden in zahlreichen pharmakologischen Studien bereits nachgewiesen [152]. Mittlerweile wurde im Rahmen von warmen Ischämiemodellen eine Spendervorbehandlung mit Statinen untersucht und unterschiedlichste Effekte nachgewiesen.

Interagierende Wirkstoffe (Starke CYP3A4-Hemmer)	Verschreibungsempfehlungen
Intraconazol Ketoconazol Fluconazol Posaconazol Erythromycin Clarithromycin Telothromycin HIV-Protease-Hemmer (z.B. Nelfinavir) Nefazodon Gemfibrozil	Kontraindiziert in Kombination mit Simvastatin
Ciclosporin Danazol Andere Fibrate (ausgenommen Fenofibrate) Niacin (>1g/Tag)	Einnahme von 10mg Simvastatin nicht überschreiten
Amiodaron Verapamil	Einnahme von 10mg Simvastatin nicht überschreiten
Diltiazem	Einnahme von 20mg Simvastatin nicht überschreiten
Fusidinsäure	Strenge Monitoring, ggf. Absetzen der Simvastatintherapie
Grapefruitsaft	vermeiden

Abb. 27: Auflistung der mit Simvastatin interagierenden Substanzen, mit denen eine Komedikation vermieden werden sollte. (Abb. nach Merck Simvastatin)

Haylor et al. vermuteten eine Inhibition der proinflammatorisch wirkenden Caspase-3 durch Applikation von Atorvastatin in einem renalen warmen Ischämiedeckel [69]. Weitere Studien vor allem in kardialen Ischämiedeckeln beschreiben eine Involvierung des P38 MAPK Signalwegs mit Induktion von Hitzeschockproteinen wie HO-1 durch Statintherapie [151]. Lai et al. [68] führten eine Präkonditionierung mit einmalig 5mg/kg Simvastatin (i.p) in einem warmen Ischämiedeckel der Leber durch und wiesen ebenfalls eine Induktion der HO-1 nach. Diese ging postoperativ mit erniedrigten Transaminasenkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe einher. Die vorliegende Arbeit kann die antioxidativen Wirkungen einer Statinvorbehandlung über die Induktion der HO-1 nicht bestätigen. Dennoch ließen sich Mechanismen nachweisen, die die sogenannte Transplantatimmunogenität beeinflussen. Der Begriff Transplantatimmunogenität beschreibt die Gesamtheit der Mechanismen, die schließlich zu einer verstärkten Alloreaktivität des Empfängers führen und damit das Kurz- und Langzeit-Outcome nach Organtransplantation negativ beeinflussen. Hierzu zählt einerseits das Spenderalter und die Verwendung von Organen mit erweiterten Spenderkriterien, bei denen die Organfunktion und -qualität bereits vor der Transplantation herabgesetzt und deren Kapazität auf Stressmechanismen beispielsweise im Rahmen des IRS zu reagieren, deutlich reduziert ist. Des Weiteren setzen nach Eintreten des Hirntods Prozesse wie Komplementaktivierung und

Aktivierung der Gerinnungskaskade ein, die zu einer Rekrutierung und Infiltration von Spender-DC in das Transplantat noch vor der Explantation führen und konsekutiv im Empfänger posttransplantationem eine verstärkte adaptive Immunantwort auslösen. Hinzu kommen die direkten und indirekten schädigenden inflammatorischen Mechanismen des IRS, welche ebenfalls zur Induktion einer Alloimmunantwort führen [72]. Eine Vorbehandlung des Spenders könnte somit zur Reduktion dieser zur erhöhten Immunogenität des Transplantats führenden Prozesse einen interessanten Therapieansatz darstellen. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand von durchflusszytometrischen und PCR-Daten gezeigt werden, dass eine Simvastatin-Vorbehandlung zu einer Reduktion der Migration von DC in die SLO mit gleichzeitiger verminderter Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung führt. Diese Effekte ließen sich nicht nur kurzfristig sondern auch nach 6 monatigem Follow-up nachweisen. Die protektiven Effekte, die Simvastatin vermittelt, fielen jedoch nur moderat aus, so dass sie nur zu einer leichten Erhöhung der GFR im Vergleich zur Kontrollgruppe führten. Möglicherweise könnte eine Erweiterung der Größe der vorbehandelten und Kontrollgruppen eindeutigere Ergebnisse erbringen. Auch eine Wiederholung der durchflusszytometrischen Messungen im Kurz- und Langzeitverlauf des Transplantats und der Milz könnte durch Untersuchung weitere Marker, über Qualität und Quantität der dominierenden Zellpopulationen genauere Auskunft geben. Beispielsweise ist bislang noch umstritten, ob im Rahmen des IRS eine Th1 oder eine Th17 dominierende adaptive Alloimmunantwort ausgelöst wird [178]. Im Kontext von Autoimmunerkrankungen wurde bereits die immunmodulatorischen Wirkungen von Statinen auf eine CD4+ Zell vermittelte Th1 und Th17 Antwort beschrieben [197, 198]. Den Einfluss einer Simvastatin Vorbehandlung auf die Ausprägung der T-Zell-Subpopulationen im Rahmen des IRS könnte durch durchflusszytometrische Messung der Effektorzytokine (IFN γ , IL-17) und Transkriptionsfaktoren (T-bet, RORc) in unserem Modell ebenfalls überprüft werden. Die mittels Durchflusszytometrie gezeigte signifikante Reduktion von CD4+CD3- Monozyten (Abb. 18) könnte weiterhin durch Verwendung eines Haplotyp-spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen RT1ab und OX62 (DC-Marker) präzisieren, ob es sich bei diesen Zellen um spenderspezifischen DCs handelt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten dennoch darauf hin, dass eine Spendenvorbehandlung mit Simvastatin immunmodulatorische und protektive Effekte vermittelt und die Transplantatimmunogenität durch Reduktion von Mechanismen der

Antigenprozessierung, -präsentation und T-Zell-Aktivierung im Kurz- und Langzeitverlauf beeinflusst. Weiterhin stellt eine Statinapplikation bei einem gesunden Spender ein geringfügiges Risiko für Nebenwirkungen dar. Im Falle erhöhten Spenderalters mit einem konsekutiv erhöhtem Arterioskleroserisiko könnte eine Vorbehandlung mit Statinen durch ihre NO-vermittelte Minderung endothelialer Dysfunktionen, ihre plaquestabilisierenden Wirkungen, ihre antiproliferativen Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen sowie ihre antikoagulatorischen Effekte möglicherweise neben den beschriebenen immunmodulatorischen Wirkungen nephroptektiv wirken und die renale Perfusion verbessern [199].

Literaturverzeichnis

1. Ograntransplantation, D.S.f., <http://www.dso.de/>.
2. Foundation, E.I., *annual report*. <http://www.eurotransplant.nl/>.
3. Network, O.P.a.T., *OPTN/SRTR annual report*.
<http://www.optn.transplant.hrsa.gov/>.
4. Marcen, R., et al., *Long-term graft function changes in kidney transplant recipients*. NDT Plus, 2010. **3**(Suppl_2): p. ii2-ii8.
5. Audard, V., et al., *Renal transplantation from extended criteria cadaveric donors: problems and perspectives overview*. Transpl Int, 2008. **21**(1): p. 11-7.
6. BR, R., *Report of the Crystal City meeting to maximize the use of organs recovered from the cadaver donor*. Am J Transplant, 2002. **2**: p. 701.
7. Dahmane D, A.V., Hiesse C, *Retrospective follow-up of transplantation of kidneys from 'marginal' donors*. Kidney Int 2006. **69**: p. 546
8. Port, F.K., et al., *Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors*. Transplantation, 2002. **74**(9): p. 1281-6.
9. GM, D., *Current status of kidney and pancreas transplantation in the United States, 1994–2003*. Am J Transplant, 2005. **5**: p. 904.
10. Ojo, A.O., et al., *Survival in recipients of marginal cadaveric donor kidneys compared with other recipients and wait-listed transplant candidates*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(3): p. 589-97.
11. Salahudeen, A.K., *Consequences of cold ischemic injury of kidneys in clinical transplantation*. J Investig Med, 2004. **52**(5): p. 296-8.
12. Boros, P. and J.S. Bromberg, *New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury*. Am J Transplant, 2006. **6**(4): p. 652-8.
13. Ojo, A.O., et al., *Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival*. Transplantation, 1997. **63**(7): p. 968-74.
14. Shoskes, D.A., *Nonimmunologic renal allograft injury and delayed graft function: clinical strategies for prevention and treatment*. Transplant Proc, 2000. **32**(4): p. 766-8.
15. Salahudeen, A.K., N. Haider, and W. May, *Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts*. Kidney Int, 2004. **65**(2): p. 713-8.

16. Cicora, F., et al., *Donor preconditioning with rabbit anti-rat thymocyte immunoglobulin ameliorates ischemia reperfusion injury in rat kidney transplantation*. Transpl Immunol, 2012.
17. Talab, S.S., et al., *Protective effects of acute lithium preconditioning against renal ischemia/reperfusion injury in rat: role of nitric oxide and cyclooxygenase systems*. Eur J Pharmacol, 2012. **681**(1-3): p. 94-9.
18. Gottmann, U., et al., *Influence of donor pretreatment with dopamine on allogeneic kidney transplantation after prolonged cold storage in rats*. Transplantation, 2005. **79**(10): p. 1344-50.
19. Hu, H., et al., *Protective effects of pioglitazone on renal ischemia-reperfusion injury in mice*. J Surg Res, 2012.
20. Hiroyoshi, T., et al., *Splenectomy protects the kidneys against ischemic reperfusion injury in the rat*. Transpl Immunol, 2012.
21. Salahudeen, A.K., *Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287**(2): p. F181-7.
22. Zingarelli, B., *Ischemia-Reperfusion Injury*. Springer Verlag, 2009(Science and Practice of Pediatric Critical Care Medicine): p. 10.1007/978-1-84800-921-9_20.
23. Taegtmeyer, H., L.M. King, and B.E. Jones, *Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets for pharmacotherapy*. Am J Cardiol, 1998. **82**(5A): p. 54K-60K.
24. Burne-Taney, M.J. and H. Rabb, *The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(1): p. 85-90.
25. Bonventre, J.V. and A. Zuk, *Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?* Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 480-5.
26. Chen, J.K. and S.E. Chow, *Antioxidants and myocardial ischemia: reperfusion injuries*. Chang Gung Med J, 2005. **28**(6): p. 369-77.
27. Ischiropoulos, H., *Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(3): p. 776-83.
28. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 500-8.
29. Alvarez, B. and R. Radi, *Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins*. Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 295-311.
30. Halliwell, B., *Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation*. Biochem Soc Trans, 1996. **24**(4): p. 1023-7.

31. Zingarelli, B., et al., *Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 350-8.
32. Patschan, D., S. Patschan, and G.A. Muller, *Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury*. J Transplant, 2012. **2012**: p. 764154.
33. Zhang, B., et al., *TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(5): p. 923-32.
34. Leemans, J.C., et al., *Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2894-903.
35. Loi, P., et al., *The fate of dendritic cells in a mouse model of liver ischemia/reperfusion injury*. Transplant Proc, 2004. **36**(5): p. 1275-9.
36. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
37. Kotsch, K., et al., *Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(12): p. 2049-63.
38. Rock, K.L., et al., *Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules*. Cell, 1994. **78**(5): p. 761-71.
39. Griffin, T.A., et al., *Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits*. J Exp Med, 1998. **187**(1): p. 97-104.
40. Solez, K., et al., *Adhesion molecules and rejection of renal allografts*. Kidney Int, 1997. **51**(5): p. 1476-80.
41. Rabb, H., et al., *Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure*. Kidney Int, 1997. **51**(5): p. 1463-8.
42. Vrints, C.J., *Pathophysiology of the no-reflow phenomenon*. Acute Card Care, 2009. **11**(2): p. 69-76.
43. Ganji, M.R. and A. Harririan, *Chronic allograft dysfunction: major contributing factors*. Iran J Kidney Dis, 2012. **6**(2): p. 88-93.
44. Jevnikar, A.M. and R.B. Mannon, *Late kidney allograft loss: what we know about it, and what we can do about it*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3 Suppl 2**: p. S56-67.

45. Yarlagadda, S.G., et al., *Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(3): p. 1039-47.
46. Hariharan, S., et al., *Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival*. Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 311-8.
47. Chertow, G.M., et al., *Non-immunologic predictors of chronic renal allograft failure: data from the United Network of Organ Sharing*. Kidney Int Suppl, 1995. **52**: p. S48-51.
48. Perico, N., et al., *Delayed graft function in kidney transplantation*. Lancet, 2004. **364**(9447): p. 1814-27.
49. Mangus, R.S., et al., *Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation*. Liver Transpl, 2006. **12**(2): p. 226-30.
50. Roels, L., et al., *Inferior outcome of cadaveric kidneys preserved for more than 24 hr in histidine-tryptophan-ketoglutarate solution*. Leuven Collaborative Group for Transplantation. Transplantation, 1998. **66**(12): p. 1660-4.
51. Lai, Q., et al., *Delayed graft function decreases early and intermediate graft outcomes after expanded criteria donor kidney transplants*. Transplant Proc, 2009. **41**(4): p. 1145-8.
52. Yarlagadda, S.G., et al., *Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(9): p. 2995-3003.
53. Peeters, P., et al., *Delayed graft function in renal transplantation*. Curr Opin Crit Care, 2004. **10**(6): p. 489-98.
54. Shoskes, D.A., A.R. Shahed, and S. Kim, *Delayed graft function. Influence on outcome and strategies for prevention*. Urol Clin North Am, 2001. **28**(4): p. 721-32.
55. Daly, P.J., et al., *Delayed graft function: a dilemma in renal transplantation*. BJU Int, 2005. **96**(4): p. 498-501.
56. Siedlecki, A., W. Irish, and D.C. Brennan, *Delayed graft function in the kidney transplant*. Am J Transplant, 2011. **11**(11): p. 2279-96.
57. Boom, H., et al., *Delayed graft function influences renal function, but not survival*. Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 859-66.

58. Fletcher, J.T., B.J. Nankivell, and S.I. Alexander, *Chronic allograft nephropathy*. Pediatr Nephrol, 2009. **24**(8): p. 1465-71.
59. Herrero-Fresneda, I., et al., *Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy?* Am J Pathol, 2003. **162**(1): p. 127-37.
60. Herrero-Fresneda, I., et al., *Cold ischemia in the absence of alloreactivity induces chronic transplant nephropathy through a process mediated by the platelet-activating factor*. Transplantation, 2000. **70**(11): p. 1624-31.
61. Hauet, T., et al., *Protective effect of polyethylene glycol against prolonged cold ischemia and reperfusion injury: study in the isolated perfused rat kidney*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(3): p. 946-52.
62. Timsit, M.O., et al., *Consequences of transplant quality on chronic allograft nephropathy*. Kidney Int Suppl, 2010(119): p. S54-8.
63. Yates, P.J. and M.L. Nicholson, *The aetiology and pathogenesis of chronic allograft nephropathy*. Transpl Immunol, 2006. **16**(3-4): p. 148-57.
64. Kosieradzki, M. and W. Rowinski, *Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention*. Transplant Proc, 2008. **40**(10): p. 3279-88.
65. Johnston, T.D., et al., *Sensitivity of expanded-criteria donor kidneys to cold ischaemia time*. Clin Transplant, 2004. **18 Suppl 12**: p. 28-32.
66. Collard, C.D. and S. Gelman, *Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury*. Anesthesiology, 2001. **94**(6): p. 1133-8.
67. Yokota, N., et al., *Protective effect of HMG-CoA reductase inhibitor on experimental renal ischemia-reperfusion injury*. Am J Nephrol, 2003. **23**(1): p. 13-7.
68. Lai, I.R., et al., *Pharmacological preconditioning with simvastatin protects liver from ischemia-reperfusion injury by heme oxygenase-1 induction*. Transplantation, 2008. **85**(5): p. 732-8.
69. Haylor, J.L., et al., *Atorvastatin improving renal ischemia reperfusion injury via direct inhibition of active caspase-3 in rats*. Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(6): p. 755-63.

70. Snoeijs, M.G., L.W. van Heurn, and W.A. Buurman, *Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(2): p. 190-9.
71. Sykes, M., *Mixed chimerism and transplant tolerance*. Immunity, 2001. **14**(4): p. 417-24.
72. Martins, P.N., A. Chandraker, and S.G. Tullius, *Modifying graft immunogenicity and immune response prior to transplantation: potential clinical applications of donor and graft treatment*. Transpl Int, 2006. **19**(5): p. 351-9.
73. Terasaki, P.I., et al., *High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors*. N Engl J Med, 1995. **333**(6): p. 333-6.
74. van der Woude, F.J., *Graft immunogenicity revisited: relevance of tissue-specific immunity, brain death and donor pretreatment*. Nephron, 2002. **91**(2): p. 181-7.
75. Schuurs, T.A., et al., *Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: insights in the processes of brain death*. Am J Transplant, 2004. **4**(12): p. 1972-81.
76. Cicora, F., et al., *Preconditioning donor with a combination of tacrolimus and rapamycin to decrease ischaemia-reperfusion injury in a rat syngenic kidney transplantation model*. Clin Exp Immunol, 2012. **167**(1): p. 169-77.
77. Soots, A. and P. Hayry, *Prolongation of rat cardiac allograft survival by donor pretreatment. Screening of antineoplastic drugs*. Transplantation, 1978. **25**(5): p. 259-64.
78. Nakao, A., et al., *Immunodulation of intestinal transplantation: antilymphocyte serum donor pretreatment vs. ex vivo graft irradiation*. Transplant Proc, 2002. **34**(3): p. 986-7.
79. Biguzas, M., et al., *Evaluation of UW solution in rat kidney preservation. II. The effect of pharmacological additives*. Transplantation, 1990. **49**(6): p. 1051-5.
80. Lechler, R., W.F. Ng, and R.M. Steinman, *Dendritic cells in transplantation--friend or foe?* Immunity, 2001. **14**(4): p. 357-68.
81. Sener, G., et al., *Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion*. Life Sci, 2003. **72**(24): p. 2707-18.
82. Treska, V., et al., *Can ischemia-reperfusion syndrome in transplanted kidneys procured from non-heart-beating donors be influenced by adding selenium into the reperfusion solution? An experimental study*. Transplant Proc, 2003. **35**(8): p. 3125-7.

83. Kato, H., et al., *Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation*. Am J Transplant, 2001. **1**(2): p. 121-8.
84. Peng, P.H., et al., *Pharmacological preconditioning by low dose cobalt protoporphyrin induces heme oxygenase-1 overexpression and alleviates retinal ischemia-reperfusion injury in rats*. Curr Eye Res, 2011. **36**(3): p. 238-46.
85. Katori, M., et al., *Prior induction of heat shock proteins by a nitric oxide donor attenuates cardiac ischemia/reperfusion injury in the rat*. Transplantation, 2000. **69**(12): p. 2530-7.
86. Hancock, W.W., et al., *Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes*. Nat Med, 1998. **4**(12): p. 1392-1396.
87. Martins, P.N., et al., *Induction of heme oxygenase-1 in the donor reduces graft immunogenicity*. Transplant Proc, 2005. **37**(1): p. 384-6.
88. Fondevila, C., et al., *Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1333-41.
89. Martins, P.N., et al., *Induction of carbon monoxide in the donor reduces graft immunogenicity and chronic graft deterioration*. Transplant Proc, 2005. **37**(1): p. 379-81.
90. Jeney, V., et al., *Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme*. Blood, 2002. **100**(3): p. 879-87.
91. Ferenbach, D.A., et al., *Macrophages expressing heme oxygenase-1 improve renal function in ischemia/reperfusion injury*. Mol Ther, 2010. **18**(9): p. 1706-13.
92. Regner, K.R. and R.J. Roman, *Role of medullary blood flow in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012. **21**(1): p. 33-8.
93. Tullius, S.G., et al., *Induction of heme-oxygenase-1 prevents ischemia/reperfusion injury and improves long-term graft outcome in rat renal allografts*. Transplant Proc, 2001. **33**(1-2): p. 1286-7.
94. Tsuchihashi, S., C. Fondevila, and J.W. Kupiec-Weglinski, *Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury*. Ann Transplant, 2004. **9**(1): p. 84-7.
95. Zager, R.A., A.C. Johnson, and K. Becker, *Plasma and Urinary Heme Oxygenase-1 in Acute Kidney Injury*. J Am Soc Nephrol, 2012.

96. Holzen, J.P., et al., *Influence of heme oxygenase-1 on microcirculation after kidney transplantation*. J Surg Res, 2008. **148**(2): p. 126-35.
97. Braggins, P.E., et al., *Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **141**(2): p. 528-33.
98. Grochot-Przeczek, A., J. Dulak, and A. Jozkowicz, *Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology*. Clin Sci (Lond), 2012. **122**(3): p. 93-103.
99. Hayashi, S., et al., *Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene*. Gene, 2004. **336**(2): p. 241-50.
100. Tracz, M.J., et al., *Deficiency of heme oxygenase-1 impairs renal hemodynamics and exaggerates systemic inflammatory responses to renal ischemia*. Kidney Int, 2007. **72**(9): p. 1073-80.
101. Loboda, A., et al., *Heme oxygenase-1-dependent and -independent regulation of angiogenic genes expression: effect of cobalt protoporphyrin and cobalt chloride on VEGF and IL-8 synthesis in human microvascular endothelial cells*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2005. **51**(4): p. 347-55.
102. Applegate, L.A., et al., *Two genes contribute to different extents to the heme oxygenase enzyme activity measured in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: implications for protection against oxidant stress*. Photochem Photobiol, 1995. **61**(3): p. 285-91.
103. Jozkowicz, A., et al., *Effect of prostaglandin-J(2) on VEGF synthesis depends on the induction of heme oxygenase-1*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(4): p. 577-85.
104. Foresti, R., et al., *Thiol compounds interact with nitric oxide in regulating heme oxygenase-1 induction in endothelial cells. Involvement of superoxide and peroxynitrite anions*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 18411-7.
105. Alam, J., S. Shibahara, and A. Smith, *Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells*. J Biol Chem, 1989. **264**(11): p. 6371-5.
106. Cisowski, J., et al., *Role of heme oxygenase-1 in hydrogen peroxide-induced VEGF synthesis: effect of HO-1 knockout*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **326**(3): p. 670-6.

107. Rizzardini, M., et al., *Mechanisms of endotoxin-induced haem oxygenase mRNA accumulation in mouse liver: synergism by glutathione depletion and protection by N-acetylcysteine*. Biochem J, 1994. **304** (Pt 2): p. 477-83.
108. Choi, A.M. and J. Alam, *Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. **15**(1): p. 9-19.
109. Inamdar, N.M., Y.I. Ahn, and J. Alam, *The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**(3): p. 570-6.
110. Prestera, T., et al., *Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE)*. Mol Med, 1995. **1**(7): p. 827-37.
111. Li, C., et al., *Pharmacologic induction of heme oxygenase-1*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(12): p. 2227-39.
112. Furchtgott, R.F. and D. Jothianandan, *Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light*. Blood Vessels, 1991. **28**(1-3): p. 52-61.
113. Brune, B. and V. Ullrich, *Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase*. Mol Pharmacol, 1987. **32**(4): p. 497-504.
114. Freitas, A., et al., *Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(4): p. 345-54.
115. Thorup, C., et al., *Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 2): p. F882-9.
116. Brouard, S., et al., *Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1015-26.
117. Katori, M., R.W. Busuttil, and J.W. Kupiec-Weglinski, *Heme oxygenase-1 system in organ transplantation*. Transplantation, 2002. **74**(7): p. 905-12.
118. Dulak, J., et al., *Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(2): p. 229-40.

119. Grochot-Przeczek, A., et al., *Heme oxygenase-1 accelerates cutaneous wound healing in mice*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5803.
120. Dudnik, L.B. and N.G. Krapova, *Characterization of bilirubin inhibitory properties in free radical oxidation reactions*. Membr Cell Biol, 1998. **12**(2): p. 233-40.
121. Asad, S.F., et al., *Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure-activity study*. Chem Biol Interact, 2001. **137**(1): p. 59-74.
122. Baranano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16093-8.
123. Hayashi, S., et al., *Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme*. Circ Res, 1999. **85**(8): p. 663-71.
124. Otterbein, L.E., Soares, M.P., *Heme oxygenase 1: unleashing the protective properties of heme*. Trends Immunol, 2003. **24**: p. 449-455.
125. Bohne, F., et al., *Intra-graft expression of genes involved in iron homeostasis predicts the development of operational tolerance in human liver transplantation*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 368-82.
126. Lin, Q., et al., *Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20621-33.
127. Katori, M., et al., *Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway*. Transplantation, 2002. **73**(2): p. 287-92.
128. Amersi, F., et al., *Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury*. J Clin Invest, 1999. **104**(11): p. 1631-9.
129. Uchida, Y., et al., *De novo protein synthesis induced by donor nutritional depletion ameliorates cold ischemia and reperfusion injury in rat liver*. Transplant Proc, 2000. **32**(7): p. 1657-9.
130. Coito, A.J., et al., *Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury*. Transplantation, 2002. **74**(1): p. 96-102.

131. Blydt-Hansen, T.D., et al., *Gene transfer-induced local heme oxygenase-1 overexpression protects rat kidney transplants from ischemia/reperfusion injury*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(3): p. 745-54.
132. Squiers, E.C., et al., *Pretreatment of small bowel isograft donors with cobalt-protoporphyrin decreases preservation injury*. Transplant Proc, 1999. **31**(1-2): p. 585-6.
133. Pileggi, A., et al., *Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation*. Diabetes, 2001. **50**(9): p. 1983-91.
134. Kist, A., et al., *Rapamycin Induces Heme Oxygenase-1 in Liver but Inhibits Bile Flow Recovery after Ischemia*. J Surg Res, 2011.
135. DeBruyne, L.A., et al., *Gene transfer of immunomodulatory peptides correlates with heme oxygenase-1 induction and enhanced allograft survival*. Transplantation, 2000. **69**(1): p. 120-8.
136. Galbraith, R.A. and A. Kappas, *Regulation of food intake and body weight by cobalt porphyrins in animals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7653-7.
137. Smith, T.J., G.S. Drummond, and A. Kappas, *Cobalt-protoporphyrin suppresses thyroid and testicular hormone concentrations in rat serum: a novel action of this synthetic heme analogue*. Pharmacology, 1987. **34**(1): p. 9-16.
138. Rosenberg, D.W. and A. Kappas, *The comparative abilities of inorganic cobalt and cobalt-protoporphyrin to affect copper metabolism and elevate plasma ceruloplasmin*. Pharmacology, 1995. **50**(3): p. 201-8.
139. Grosser, N., et al., *Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(4): p. 956-60.
140. Heinecke, J.W., *Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander?* J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 813-6.
141. Kaga, S., et al., *Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(5): p. 813-22.
142. Grosser, N., et al., *The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(12): p. 2064-71.
143. Grosser, N., et al., *Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(3): p. 871-6.

144. Lee, T.S., et al., *Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection*. Circulation, 2004. **110**(10): p. 1296-302.
145. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. Lancet, 1994. **344**(8934): p. 1383-9.
146. *MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2002. **360**(9326): p. 7-22.
147. Pedersen, T.R., et al., *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. 1994. Atheroscler Suppl, 2004. **5**(3): p. 81-7.
148. Sacks, F.M., et al., *The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels*. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. N Engl J Med, 1996. **335**(14): p. 1001-9.
149. Shepherd, J., *The West of Scotland Coronary Prevention Study: a trial of cholesterol reduction in Scottish men*. Am J Cardiol, 1995. **76**(9): p. 113C-117C.
150. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Regulation of the mevalonate pathway*. Nature, 1990. **343**(6257): p. 425-30.
151. Kong, W. and Y. Zhu, *The pleiotropic effects of statins in the prevention of atherosclerosis : Editorial to: "Simvastatin suppresses apoptosis in vulnerable atherosclerotic plaques through regulating the expression of p53, Bcl-2 en Bcl-xL" by Weiwei Qin et al*. Cardiovasc Drugs Ther, 2012. **26**(1): p. 5-7.
152. Zhou, Q. and J.K. Liao, *Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives*. Circ J, 2010. **74**(5): p. 818-26.
153. Saeki, T., et al., *Low incidence of cardiac events in statin-administered patients in CAG study*. J Atheroscler Thromb, 2009. **16**(3): p. 172-8.
154. Ferro, D., et al., *Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(2): p. 427-31.
155. Inoue, I., *Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1 β , interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) in primary endothelial cells*. Life Sci, 2000. **67**(67): p. 863–876.

156. Downs, J.R., et al., *Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study*. JAMA, 1998. **279**(20): p. 1615-22.
157. Rudich, S.M., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors pravastatin and simvastatin inhibit human B-lymphocyte activation*. Transplant Proc, 1998. **30**(4): p. 992-5.
158. Shimizu, K., et al., *Direct anti-inflammatory mechanisms contribute to attenuation of experimental allograft arteriosclerosis by statins*. Circulation, 2003. **108**(17): p. 2113-20.
159. Katzenstein, S., et al., *The effect of pravastatin on acute rejection after kidney transplantation--a pilot study*. Transplantation, 1996. **61**(10): p. 1469-74.
160. Ji, P., et al., *Prevention of chronic rejection by pravastatin in a rat kidney transplant model*. Transplantation, 2002. **74**(6): p. 821-7.
161. Norby, G.E., et al., *Effect of fluvastatin on cardiac outcomes in kidney transplant patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled study*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(4): p. 1060-4.
162. Fellstrom, B., et al., *Effect of fluvastatin on renal end points in the Assessment of Lescol in Renal Transplant (ALERT) trial*. Kidney Int, 2004. **66**(4): p. 1549-55.
163. Joyce, M., et al., *Pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, attenuates renal injury in an experimental model of ischemia-reperfusion*. J Surg Res, 2001. **101**(1): p. 79-84.
164. Sabbatini, M., et al., *Atorvastatin improves the course of ischemic acute renal failure in aging rats*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(4): p. 901-9.
165. Pirhonen, J., et al., *Virus infection induces proteolytic processing of IL-18 in human macrophages via caspase-1 and caspase-3 activation*. Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 726-33.
166. Weber, C., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia*. J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(5): p. 1212-7.
167. Aviram, M., et al., *Lovastatin inhibits low-density lipoprotein oxidation and alters its fluidity and uptake by macrophages: in vitro and in vivo studies*. Metabolism, 1992. **41**(3): p. 229-35.

168. Chan, A.W., et al., *Relation of inflammation and benefit of statins after percutaneous coronary interventions*. Circulation, 2003. **107**(13): p. 1750-6.
169. Bourcier, T. and P. Libby, *HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(2): p. 556-62.
170. Tullius, S.G., et al., *Improvement of long-term function in renal allografts from 'marginal donors' following the induction of heme-oxygenase-1*. Transplant Proc, 2001. **33**(1-2): p. 1160-1.
171. Marco, M., *The Fischer–Lewis model of chronic allograft rejection—a summary*. Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**: p. 3082-3086.
172. Fisher B, L.S., *Microvascular surgical techniques in research, with special reference to renal transplantation in the rat*. Surgery 1965. **58**: p. 904- 914.
173. Schumacher, M., B.N. Van Vliet, and P. Ferrari, *Kidney transplantation in rats: an appraisal of surgical techniques and outcome*. Microsurgery, 2003. **23**(4): p. 387-94.
174. Mullis, K.B. and F.A. Falloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
175. Cordell, J.L., et al., *Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)*. J Histochem Cytochem, 1984. **32**(2): p. 219-29.
176. Diamond, J.R., et al., *Progressive albuminuria and glomerulosclerosis in a rat model of chronic renal allograft rejection*. Transplantation, 1992. **54**(4): p. 710-6.
177. Wekerle, T. and J.M. Grinyo, *Belatacept: from rational design to clinical application*. Transpl Int, 2012. **25**(2): p. 139-50.
178. Syrjala, S.O., et al., *Increased Th17 rather than Th1 alloimmune response is associated with cardiac allograft vasculopathy after hypothermic preservation in the rat*. J Heart Lung Transplant, 2010. **29**(9): p. 1047-57.
179. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
180. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
181. Chadha, R., et al., *Th17: contributors to allograft rejection and a barrier to the induction of transplantation tolerance?* Transplantation, 2011. **91**(9): p. 939-45.

182. Refaeli, Y., et al., *Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes*. J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 999-1005.
183. Kinsey, G.R., et al., *Regulatory T cells contribute to the protective effect of ischemic preconditioning in the kidney*. Kidney Int, 2010. **77**(9): p. 771-80.
184. Lee, H.T., et al., *Oxidant preconditioning protects human proximal tubular cells against lethal oxidant injury via p38 MAPK and heme oxygenase-1*. Am J Nephrol, 2003. **23**(5): p. 324-33.
185. Chen, X., et al., *Ischemic preconditioning attenuates renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting activation of IKK β and inflammatory response*. Am J Nephrol, 2009. **30**(3): p. 287-94.
186. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
187. Ezzelarab, M. and A.W. Thomson, *Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation*. Semin Immunol, 2011. **23**(4): p. 252-63.
188. Burrell, B.E., et al., *CD8+ Th17 mediate costimulation blockade-resistant allograft rejection in T-bet-deficient mice*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3906-14.
189. Coux, O., K. Tanaka, and A.L. Goldberg, *Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 801-47.
190. Sutherland, R.M., et al., *Selective depletion of cross-presenting dendritic cells enhances islet allograft survival*. Cell Transplant, 2011. **20**(3): p. 467-74.
191. Ackerman, A.L. and P. Cresswell, *Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 678-84.
192. Palmowski, M.J., et al., *Role of immunoproteasomes in cross-presentation*. J Immunol, 2006. **177**(2): p. 983-90.
193. Chapatte, L., et al., *Processing of tumor-associated antigen by the proteasomes of dendritic cells controls in vivo T-cell responses*. Cancer Res, 2006. **66**(10): p. 5461-8.
194. Strehl, B., et al., *Immunoproteasomes are essential for clearance of *Listeria monocytogenes* in nonlymphoid tissues but not for induction of bacteria-specific CD8+ T cells*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6238-44.
195. Pye, J., et al., *Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(3): p. H919-26.

196. Rifkin, S.I., *Multiple drug interactions in a renal transplant patient leading to simvastatin-induced rhabdomyolysis: a case report*. Medscape J Med, 2008. **10**(11): p. 264.
197. Li, X.L., et al., *Atorvastatin ameliorates experimental autoimmune neuritis by decreased Th1/Th17 cytokines and up-regulated T regulatory cells*. Cell Immunol, 2011. **271**(2): p. 455-61.
198. Zhang, X. and S. Markovic-Plese, *Statins' immunomodulatory potential against Th17 cell-mediated autoimmune response*. Immunol Res, 2008. **41**(3): p. 165-74.
199. M, I., *Nichtlipidsenkende Effekte von Statinen*. Dtsch. Ärztebl, 2004. **101** (6)(A-352/B-300/C-293).

Vorträge und Posterpräsentationen

- 2007 Vortrag und Posterpräsentation
Donor pretreatment with Simvastatin reduces graft immunogenicity following prolonged cold ischemia in an experimental model of kidney transplantation
Manije Sabet, Maja Frankuski, Anja Reutzel-Selke, Andreas Pascher, Peter Neuhaus, Johann Pratschke, Katja Kotsch
Kongress der Deutschen Gesellschaft für Immunologie,
Heidelberg, Deutschland
- 2007 Vortrag
Simvastatin as Donor Pre-Treatment Reduces Graft Immunogenicity Following Prolonged Cold Ischemia in an Experimental Model of Kidney Transplantation
Katja Kotsch, Maja Frankuski, Manije Sabet, Anja Reutzel-Selke, Andreas Pascher, Peter Neuhaus, Johann Pratschke
European Society of Transplantation,
Prag, Tschechische Republik
- 2008 Vortrag
Donor pretreatment with Simvastatin reduces graft immunogenicity following prolonged cold ischemia in an experimental model of kidney transplantation
Manije Sabet, Maja Frankuski, Anja Reutzel-Selke, Andreas Pascher, Peter Neuhaus, Johann Pratschke, Katja Kotsch
European Student Conference,
Charité Berlin, Deutschland

- 2008 Vortrag
Donor treatment with Simvastatin reduces graft immunogenicity following prolonged cold ischemia and ameliorates long-term survival
M. Sabet, K. Kotsch, M. Francuski, A. Reutzel-Selke, A. Pascher, F. Ulrich, P. Neuhaus, J. Pratschke
Kongress der deutschen Transplantationsgesellschaft
Bochum, Deutschland
- 2009 Vortrag
Donor treatment with Simvastatin reduces graft immunogenicity following prolonged cold ischemia and ameliorates long-term survival
M. Sabet, K. Kotsch, M. Francuski, A. Reutzel-Selke, A. Pascher, F. Ulrich, P. Neuhaus, J. Pratschke
Kongress der deutschen Transplantationsgesellschaft
Bochum, Deutschland
- 2009 Vortrag
Donor Pretreatment with Simvastatin Reduces Graft Immunogenicity Following Prolonged Cold Ischemia in the Long-Term.
Katja Kotsch, Manije Sabet, Maja Frankuski, Anja Reutzel-Selke, Andreas Pascher, Peter Neuhaus, Johann Pratschke.
American Transplant Congress
Boston, USA

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Johann Pratschke, Chefarzt der Viszeral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Innsbruck, und Frau Professor Dr. Katja Kotsch, Leitung des Daniel Swarovski Forschungslabors der Universität Innsbruck, für die Betreuung der Arbeit und die Geduld bedanken. Diese Arbeit entstand in Zusammenarbeit des Virchow Klinikums Berlin und dem Institut der Immunologie der Charité Berlin.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Maja Francuski und den Labormitarbeitern des Virchow Klinikums Berlin, des Instituts der Immunologie, Charité Berlin, und des Forschungslabors der Universitätsklinik Regensburg für die Unterstützung bei durchflusszytometrischen Messungen und immunhistochemischen Färbungen sowie Herrn Dietrich Polenz für die Durchführung der Nierentransplantationen in Ratten.

Schließlich bedanke ich mich bei Herrn Professor Edward Geissler, PhD, Leiter der experimentellen Chirurgie der Universitätsklinik Regensburg, und Herrn Professor Dr. Hans-Jürgen Schlitt, Chefarzt der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universitätsklinik Regensburg, die mir eine Fertigstellung dieser Arbeit an der Universitätsklinik Regensburg ermöglichten.