

**Malonitrilamid 715  
als Immunsuppressivum  
im Modell der heterotopen Herztransplantation  
in der Maus**

**Klaus Erich Gerauer**

**Chirurgische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar**

**(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J.R. Siewert)**

**Malononitrilamid 715  
als Immunsuppressivum  
im Modell der heterotopen Herztransplantation  
in der Maus**

**Klaus Erich Gerauer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. C.-D. Heidecke,  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
2. Univ.-Prof. Dr. J.R. Siewert

Die Dissertation wurde am 17.10.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 07.02.2001 angenommen.

Meinen Eltern  
Rosemarie und Erich Gerauer  
in Dankbarkeit gewidmet

## Abkürzungsverzeichnis:

A77 1726	Leflunomid Hauptmetabolit
ADCC	Antibody dependent cytotoxicity
APC	Antigen-präsentierende-Zelle
ATG	Anti-T-Lymphozyten-Globulin
CD	Cluster of Differentiation
CMC	Carboxymethylcellulose
DHO-DH	Dihydroorotat-Dehydrogenase
DTH	delayed type hypersensitivity
FKBP	FK-bindendes Protein
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
HLA	human leukocyte antigene
HTx	Herztransplantation
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL-10	Interleukin-10
IL-1- $\beta$	Interleukin-1- $\beta$
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IP-10	Interferon- $\gamma$ -inducible protein
kd	Kilodalton
LAK	lymphokinaktivierte Killerzelle
LFA	Imphocyte function-associated antigene
Ltn	Lymphotactin
mAb	monoklonaler Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
MNA 715	Malononitrilamid 715
mRNS	messenger RNS
NF-AT	nuclear factor of activation in T cells
NK	natural killer
NF- $\kappa$ B	nuklear factor- $\kappa$ B
OKT3	Anti-CD3-Antikörper
p.o.	per os, oral
RANTES	regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted
RNS	Ribonukleinsäure
RPA	RNase Protection Assay
s.c.	subcutan
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

<b>Inhaltsverzeichnis:</b>	<b>Seite</b>
1. Einleitung und Zielsetzung	7
1.1. Einführung	7
1.2. Immunologische Grundlagen der Transplantatabstoßung	
1.2.1. Antigenpräsentation	8
1.2.2. T-Lymphozyten und T-Zell-Rezeptor (TCR)	9
1.2.3. T-Zell-Aktivierung, Kostimulation und Zytokine	10
1.2.4. Chemokine und Transplantatabstoßung	12
1.2.5. Mechanismen der zellulären und humoralen Transplantatabstoßung in vivo	13
1.3. Einteilung der Abstoßungsreaktionen	13
1.3.1. Hyperakute Abstoßung	14
1.3.2. Akute Abstoßung	14
1.3.3. Chronische Abstoßung	15
1.4. Wirkungsweise der verwendeten Immunsuppressiva	15
1.4.1. FK 506	15
1.4.2. Leflunomid und Malononitrilamid	16
1.5. Eigene Fragestellung	17
2. Material und Methode	18
2.1. In vivo	18
2.1.1. Tiermodell	18
2.1.2. Genehmigung der Tierversuche	18
2.1.3. Tierspezies und Tierhaltung	18
2.1.4. Anästhesie	19
2.1.5. Operation	19
2.1.5.1. Operationsinstrumentarium	19
2.1.5.2. Das Modell der heterotopen Herztransplantation in der Maus	20
2.1.5.2.1. Spenderoperation und Transplantatpräparation	20
2.1.5.2.2. Empfängeroperation	21
2.1.5.2.3. Transplantatentnahme	21
2.1.6. Medikation	22
2.1.6.1. Immunsuppression mit FK 506	22
2.1.6.2. Immunsuppression mit Malononitrilamid 715 (MNA 715)	22
2.1.6.3. Kombinierte Immunsuppression	23
2.1.6.4. Allgemeine Medikation	23
2.1.7. Transplantatmonitoring in der Maus	24
2.1.7.1. Fingerpalpation	24
2.1.7.2. Diagnostische Laparotomie	24

2.2. Ex vivo	25
2.2.1. Histologische Untersuchung der Transplantate	25
2.2.1.1. Konventionelle Histologie	25
2.2.1.2. Immunhistologische Färbung	26
2.2.2. RNS-Isolierung	27
2.2.3. Das RNase Protektion Assay	28
2.3. Statistik	30
2.4. Gruppeneinteilung	30
3. Ergebnisse	32
3.1. Beeinflussung der Transplantatabstoßung in vivo	32
3.1.1. Transplantatüberleben in den Kontrollgruppen	32
3.1.2. Transplantatüberleben unter Immunsuppression mit FK 506	33
3.1.3. Transplantatüberleben unter Immunsuppression mit MNA 715	34
3.1.4. Transplantatüberleben unter kombinierter Immunsuppression	35
3.1.5. Zusammenfassung der Transplantatüberlebenskinetik	37
3.2. Beeinflussung der Abstoßung ex vivo	38
3.2.1. Konventionelle Histologie	38
3.2.2. Immunhistologie	41
3.2.3. RNase Protektion Assay	42
4. Diskussion	47
5. Zusammenfassung	53
6. Literaturverzeichnis	55

## 1. Einleitung und Zielsetzung

### 1.1. Einführung

Die Manifestation einer Abstoßungsreaktion ist gekennzeichnet durch das Zusammenspiel verschiedener Elemente des Immunsystems. Die spezifische Immunreaktion des Empfängers gegen ein Transplantat wird im wesentlichen durch Subpopulationen von Lymphozyten mediiert. Hierbei spielen unter anderem CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten eine zentrale Rolle. Diese Zellen helfen bei der Proliferation und Differenzierung von Effektorzellen. Ein Großteil der Hilfestellung wird durch die Produktion und Freisetzung von löslichen Botenstoffen (Zytokinen/Lymphokinen) geleistet, die an der Hochregulation der Immunreaktion beteiligt sind (10, 147). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß auch B-Lymphozyten bzw. Antikörper (155) (108) und Mastzellen (81) am Abstoßungsgeschehen beteiligt sind. Schließlich begünstigt jede Episode einer akuten Rejektion das spätere Auftreten eines chronischen Transplantatversagens (148).

Die gängigen Immunsuppressiva (v.a. Cyclosporin A (CsA) und FK 506) greifen hauptsächlich über die Beeinflussung der T-Lymphozyten (137). Einzig die Wirkstoffklasse der Glukokortikoide stellt diesbezüglich eine Ausnahme dar. Ihr Einsatz ist aber mit einer hohen Nebenwirkungsrate vergesellschaftet (150). Die Etablierung neuer immunsuppressiver Substanzen, die gleichermaßen verschiedene Komponenten des Abstoßungsgeschehens beeinflussen, könnte dazu beitragen, die derzeit gängigen Regime in der Prävention und Therapie von Transplantatabstoßung zu optimieren und bezüglich ihres Nebenwirkungsspektrums zu entschärfen. Mit den Malononitrilamiden steht seit einiger Zeit eine vielversprechende Wirkstoffklasse zur Verfügung. Ein Vertreter der Malononitrilamide, das Malononitrilamid 715 (MNA 715), soll im Rahmen der vorliegenden Dissertation bezüglich seiner Einsatzmöglichkeiten bei der Immunsuppression nach Organtransplantationen, untersucht werden.

## 1.2. Immunologische Grundlagen der Transplantatabstoßung

### 1.2.1. Antigenpräsentation

Die entscheidende Rolle beim immunologischen Transplantatverlust spielen die sog. Transplantationsantigene des „major histocompatibility complex“ (MHC), die durch eine Vielzahl von Genen kodiert werden (67-69, 143). Beim Menschen bezeichnet man den MHC-Komplex als „human leucocyte antigene“ (HLA) (42). Die kodierenden Gene befinden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nummer 6. Die HLA-Antigene werden in 2 Gruppen unterteilt. Die Proteine der Klasse I (HLA A, B und C) präsentieren fremde Epitope den CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die der Klasse II (HLA D/DR) den CD4<sup>+</sup> T-Zellen (67-69, 143). HLA-Klasse-I-Antigene werden mit Ausnahme der Erythrozyten auf fast allen Zellen als polymorphe Membranglykoproteine exprimiert. Klasse II Antigene findet man dagegen nur auf B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen. Ihre Expression ist demnach auf einen Teil der Zellen des Immunsystems beschränkt (39, 40, 63). Die Expression der Klasse I und II MHC-Moleküle unterliegt *in vitro* einer Regulierung durch Zytokine, wie z.B. IFN- $\gamma$ . *In vivo* beobachtet man eine verstärkte Expression im Rahmen einer Immunantwort, wie sie z.B. die Transplantatabstoßung darstellt. Eine Hochregulierung von MHC-Molekülen kann zwar zu einer verstärkten Transplantatimmunogenität beitragen, ist *per se* allerdings nicht pathognomonisch für eine Abstoßungsreaktion, da sie auch in toleranten Empfängern zu beobachten ist (6, 8, 56, 95, 119).

Die Klasse-I-Proteine bestehen aus einer 44-kd- $\alpha$ -Kette, die nichtkovalent mit einem 12-kd-Polypeptid, dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin, verbunden ist. Die  $\alpha$ -Kette setzt sich aus drei extrazellulären Domänen ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$ ), einem Transmembransegment und einem cytosolischen Schwanz zusammen. Die Klasse-I-Proteine unterscheiden sich v.a. in den  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domänen. Die  $\alpha_3$ -Domäne, die mit dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin in Wechselwirkung steht, ist weitgehend konserviert. Klasse-II-Proteine bestehen aus einer 35-kd- $\alpha$ -Kette und einer nichtkovalent gebundenen 29-kd- $\beta$ -Kette. Jede weist zwei extrazelluläre Domänen, ein Transmembransegment und einen kurzen zytosolischen Schwanz auf. Auch Klasse-II-Proteine besitzen konstante und variable Regionen. Bei beiden sind die einzelnen Komponenten dabei so angeordnet, daß die konstanten Anteile eine extrazellulär gelegene Vertiefung bilden, in der die variablen Aminosäuresequenzen zu liegen kommen. Hier werden variable Peptidfragmente gebunden, die aus intrazellulär abgebauten Proteinen stammen (13,

14, 18, 75). Je nach Klasse werden diese Peptidfragmente unterschiedlichen Subpopulationen von T-Lymphozyten präsentiert. Klasse I sind der Angriffspunkt von Alloantikörpern und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten. Sie präsentieren v.a. zytosolische Antigene, wie virale oder allogene Peptide (3, 45). HLA-Antigene der Klasse II sind Angriffspunkte von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (TH1 bzw. TH2). Durch sie werden exogene Antigene nach intrazellulärer Prozessierung als Peptidfragmente präsentiert (162).

### 1.2.2. T-Lymphozyten und T-Zell-Rezeptor (TCR)

Die adaptive Immunreaktion wird unter anderem durch zwei Arten von Lymphozyten gewährleistet, den T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Sie stellen wesentliche Komponenten der zellulären bzw. der humoralen Immunität dar. Man spricht in diesem Zusammenhang von der Dichotomie der Lymphozyten. T-Lymphozyten gehen, wie alle anderen Blutzellen, auf eine pluripotente Stammzelle zurück. Im Knochenmark können sich aus dieser pluripotenten Stammzelle alle hämatopoetischen Zelllinien entwickeln. Für die T-Lymphopoese muß die Stammzelle (=Lymphoprogenitorzelle) das Knochenmark verlassen und via Blutweg in den Thymus gelangen. Im Thymus erfolgen dann im wesentlichen zwei Selektionsschritte. Zum einen werden alle T-Lymphozyten eliminiert, deren Rezeptoren kein Erkennungsvermögen für MHC aufweisen (=positive Selektion, MHC-Restriktion), zum anderen alle T-Lymphozyten mit Rezeptoren für MHC + Selbstpeptid (=negative Selektion, hierdurch wird eine Autoreaktivität der T-Zellen verhindert) (19, 80, 149).

Reife T-Lymphozyten lassen sich in 2 Phänotypen unterteilen: CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Antigene, die auf MHC-Klasse-II dargeboten werden. Sie wurden früher als T-Helferzellen bezeichnet. Sie differenzieren sich zu TH1-Zellen oder TH2-Zellen und vermitteln so eine zellvermittelte (TH1) oder eine humorale (TH2) Immunreaktion. CD8<sup>+</sup> T-Zellen (früher als Killerzellen bezeichnet) könne nach erfolgter Aktivierung Zellen angreifen, welche das spezifische Antigen auf MHC-Klasse-I präsentieren (89, 118).

Die (Allo)Antigenerkennung durch T-Lymphozyten erfolgt über den T-Zell-Rezeptor (TCR). Er besteht aus einer 43-kd- $\alpha$ -Kette und einer 43-kd- $\beta$ -Kette. Beide Ketten sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden, durchspannen die Plasmamembran und weisen auf der Zytosolseite eine carboxyterminale Region auf. Ähnlich der L- und H-Ketten der Immunglobuline besitzen die Ketten des TCR variable und konstante Regionen. Dabei formieren die variablen Regionen die Bindungsstelle für das passende Antigen (präsentiert

über den MHC-Komplex) (93). Die Signaltransduktion nach intrazellulär erfolgt über den CD3-Komplex, welcher eng mit dem TCR assoziiert ist (38, 124). Die beschriebene Interaktion des Antigen-MHC-Komplexes mit der variablen Region des TCR wird durch zusätzliche Paare akzessorischer Moleküle verstärkt. Als antigenunabhängige Rezeptor-Liganden-Paare sind sie in unterschiedlicher Weise in die Zelladhäsion, Aktivierung und spezifische Effektorfunktionen involviert. Zu diesen Strukturen zählen CD4 und CD8. Sie binden MHC-Klasse-II bzw. MHC-Klasse-I und erhöhen so die Bindung des Antigen-MHC-Komplexes. Außerdem sind sie an der Signaltransduktion beteiligt (113). Weitere Rezeptor-Liganden-Paare (RLP) zwischen T-Lymphozyt und antigenpräsentierender Zelle (APC) sind LFA-1 (CD11a, CD18a) mit den Liganden ICAM-1 (CD54) und ICAM-2 (141) sowie LFA-2 (CD2) und sein Ligand LFA-3 (CD58) (142). Diese RLP ermöglichen eine lockere, antigenunabhängige Bindung des T-Lymphozyten mit der APC und verlängern so die Kontaktzeit zwischen beiden Partnern, was ein genaueres Absuchen der APC durch den T-Lymphozyten nach dem passenden Antigen ermöglicht. Zusätzlich erfolgt die ebenfalls antigenunabhängige Interaktion des CD28-Rezeptors der T-Zelle mit den Liganden B7-1 bzw. B7-2 der APC.

### 1.2.3. T-Zell-Aktivierung, Kostimulation und Zytokine

Da sowohl von Leflunomiden als auch von FK 506 bekannt ist, daß sie unter anderem über eine Hemmung der Signaltransduktion wirken (48, 138), soll an dieser Stelle genauer auf die Vorgänge eingegangen werden, welche sich nach erfolgter Interaktion des TCR mit dem MHC abspielen.

Das Korrelat einer erfolgten T-Zell-Aktivierung *in vivo* ist die Synthese von IL-2 und anderer Lymphokine. Dadurch wird die T-Zelle zur Proliferation und Differenzierung zur Effektorzelle angeregt (20, 46, 96). Jedoch vermag die alleinige Interaktion des TCR/CD3-Komplexes mit dem passenden AG/MHC-Komplex noch keine koordinierte Immunantwort auszulösen. Initial kommt es zunächst zu einer Aktivierung von Tyrosin-Kinasen (z.B. von  $p59^{fyn}$  und/oder  $p56^{lck}$ ), welche dann eine Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener intrazellulärer Substrate induziert. Einen zentralen Schritt stellt dabei die Phosphorylierung der intrazellulären CD3- $\zeta$ -Kette dar (48, 156). Dadurch wird die Aktivierung einer weiteren Tyrosin-Kinase, der ZAP-70 ermöglicht (30, 163). Die Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert das Phospholipase C Isoenzym- $\gamma 1$  (PLC- $\gamma 1$ ), welches Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu

Inositol-1,4,5-Triphosphat und Diacylglycerol hydrolysiert. Inositol-1,4,5-Triphosphat mobilisiert intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ , während Diacylglycerol zusammen mit  $\text{Ca}^{2+}$  die Protein-Kinase C aktiviert (82). Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin führt zur Aktivierung von Calcineurin, einer Phosphatase, die den „nuclear factor of activation in T-cells“ (NF-AT) dephosphoryliert, welcher dann die Kernmembran durchdringen kann. Der dephosphorylierte NF-AT bindet an die Promotorregion des IL-2 Gens, was zu dessen Transkriptionsaktivierung führt (82). Am nicht translatierten 3'-Ende der IL-2 mRNA befindet sich jedoch eine Instabilitätssequenz, die dafür verantwortlich ist, daß nur ein geringer Anteil der IL-2 mRNA in das entsprechende Protein IL-2 umgesetzt wird (23-26). Zur Stabilisierung der IL-2 mRNA benötigen T-Zellen ein zweites sog. kostimulatorisches Signal. Dadurch erst wird eine adäquate Translation der IL-2 mRNA in IL-2 und eine effektive T-Zell-Aktivierung ermöglicht. Nach heutigen Erkenntnissen wird die Rolle der Kostimulation auf Seiten der APC durch die Liganden B7-1 und B7-2 erfüllt (41). Sie binden an den korrespondierenden CD28-Rezeptor, einem Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, auf der T-Zelle. Naive T-Zellen verfügen mit CD-28 nur über einen Rezeptor für B7 (54). Erst nach ihrer Aktivierung produzieren sie mit CTLA4 einen weiteren zu B7-1 und B7-2 hochaffinen Rezeptor. Die genaue Rolle von CTLA4 ist noch nicht endgültig geklärt. Es gibt Hinweise dafür, daß es die Apoptose aktivierter T-Zellen einleitet und damit den Organismus vor einer übersteigerten Immunantwort bewahrt (15, 16, 106, 107). Ein Fehlen der Kostimulation resultiert in einer Anergie der T-Zelle, auch wenn der erneute Kontakt mit dem entsprechenden Antigen unter adäquater Kostimulation erfolgt (134, 160, 161).

CD8+ Zellen können auch ohne CD28/B7 Kostimulation IL-2 Rezeptoren exprimieren. Das benötigte IL-2 kann auch auf parakrinem Weg von CD4+ T-Zellen geliefert werden (77). Die Expression von IL-2 Rezeptoren ist allerdings transient. Ihre Zahl reduziert sich in vitro und die Zellproliferation kommt zum Erliegen, was einen wesentlichen Autoregulationsmechanismus der T-Zell-Antwort darstellt (20, 59). CD4+ T-Zellen werden nach ihrer charakteristischen Zytokinproduktion in TH1- und TH2-Zellen eingeteilt (98, 100). TH1-Zellen produzieren u.a. IL-2 und IFN- $\gamma$ . Sie sind für die Immunantwort vom verspäteten Typ verantwortlich (DTH). TH2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10. Sie sind an der T-B-Zell-Interaktion und der damit verbundenen Antikörperproduktion beteiligt. Dabei vermag insbesondere IL-10 TH1-Zytokine zu supprimieren und damit die TH1-Antwort zu drosseln (51, 99). Je nach Differenzierung der CD4+ Zelle in TH1 oder TH2 kann die Immunantwort in die eine oder andere Richtung gelenkt werden (9, 44, 62, 105, 145). Eine selektive

Aktivierung inflammatorischer TH1-Zellen führt so zu einer zellvermittelten Immunreaktion. Die Aktivierung von TH2-Zellen zieht eine humorale Immunantwort nach sich (127). Durch Antikörper gegen TH2-Zytokine kann die DTH-vermittelte Immunreaktion gesteigert werden (135). Gegen CD4 gerichtete monoklonale Antikörper können TH2-Zytokine in transplantatinfiltrierenden Zellen und in Milzzellen induzieren und so das Transplantatüberleben deutlich verlängern (112).

#### 1.2.4. Chemokine und Transplantatabstoßung

In jüngster Zeit rückt eine Gruppe von kleinen Proteinen ins Blickfeld der Transplantationsforschung. Dabei handelt es sich um die sog. Chemokine. Ihre Hauptfunktion liegt wohl in ihrer chemotaktischen Wirkung auf Leukozyten (94, 110). Chemokine werden in 2 Gruppen eingeteilt. Die Einteilung basiert auf der Position der ersten beiden Cysteinreste. Die  $\alpha$  (C-X-C) Chemokin-Familie wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind IP-10 (interferon- $\gamma$ -inducible protein), KC und Interleukin-8 (IL-8) (5, 88, 151). Die Funktion der  $\beta$  (C-C) Chemokin-Familie besteht v.a. in der Chemotaxis für Monozyten und Lymphozyten. Die Hauptvertreter dieser Gruppe sind RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted), MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein) (92, 125, 126, 129). Neben der Chemotaxis erfüllen einzelne Chemokine andere proinflammatorische Aufgaben. Hierzu zählen die Regulation der Integrin-Expression und der Zell-Adhäsion, Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation in T-Zellen und Degranulation von Neutrophilen. Zudem wirken sie über eine gesteigerte Synthese von Proteasen in T-Zellen proinflammatorisch (22, 27, 138, 154). Über die genaue Rolle der Chemokine bei der Abstoßung von vaskularisierten Organtransplantaten kann zum jetzigen Zeitpunkt nur gemutmaßt werden. Dennoch konnte gezeigt werden, daß verschiedene Phasen und Arten der Abstoßungsreaktion mit einer gesteigerten Expression bestimmter Chemokine korrelieren (103).

### 1.2.5. Mechanismen der zellulären und humoralen Transplantatabstoßung in vivo

Als Mediatoren der Transplantatabstoßung in vivo werden sowohl zelluläre als auch humorale Elemente diskutiert. Die zellvermittelte Immunreaktion wird dabei durch hochspezifische T-Zell-vermittelte Prozesse sowie durch natürliche Killerzellen (NK), Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) und Makrophagen mit geringerer Spezifität repräsentiert. Die humorale Immunreaktion findet ihr Korrelat in natürlichen, weniger spezifischen Antikörpern (v.a. vom IgM-Typ) und in hochspezifischen Antikörpern verschiedener Isotypen (meist IgG). Sie erfüllen unterschiedliche Funktionen wie Opsonisierung, Komplementaktivierung, ADCC sowie die Aktivierung von eosinophilen und basophilen Granulozyten. Alle genannten Faktoren wurden bislang als mögliche Effektoren der Transplantatabstoßung mit unterschiedlicher Bedeutung angesehen (10, 147). Verschiedene experimentelle Arbeiten der letzten Jahre zeigen die Transplantatabstoßung in einem sehr komplexen und noch nicht vollständig verstandenem Licht. Die Abstoßung wird wohl hauptsächlich durch CD4+ T-Zellen vermittelt. Bei alleiniger Disparität von Klasse-I-MHC Antigenen können CD8+ T-Zellen allerdings auch alleine als Mediator der Abstoßung fungieren (17, 61, 87, 144, 152). Zudem gibt es Hinweise dafür, daß auch B-Lymphozyten und Antikörper mit beteiligt sind (155) (108). Gerade diese Interaktion zellulärer und humoraler Elemente mit autokrin und parakrin elaborierten Zytokinen machen das Bild der Abstoßung sehr komplex. Diverse Immunsuppressiva wie CsA, FK 506, Rapamycin oder mAb's gegen T-Zell-Subpopulationen sind in der Lage, das Transplantatüberleben in vivo speziesabhängig zu verlängern, ohne es allerdings beim Menschen auf Dauer sicher gewährleisten zu können. Im Tiermodell kann die Rejektion durch Zugabe einzelner Mediatoren (Zellpopulationen, Zytokine) ausgelöst und beschleunigt werden (12, 117).

### 1.3. Einteilung der Abstoßungsreaktionen

Bis heute erfolgt die Einteilung der Abstoßungsreaktionen basierend auf dem zeitlichen Verlauf ihrer Manifestation, ohne dabei immunologische und pathologische Mechanismen zu berücksichtigen. Sie ist also primär klinisch ausgerichtet und unterscheidet hyperakute, akute und chronische Abstoßung (65, 121, 140, 153).

### 1.3.1. Hyperakute Abstoßung

Die hyperakute Abstoßung entspricht einer gegen das Gefäßsystem des Transplantats gerichteten, humoralen Reaktion. Präformierte Antikörper binden an das Gefäßendothel, wodurch die Komplement- und die Gerinnungskaskade aktiviert werden. In der Folge kommt es zu einem Influx von Granulozyten und zu einer intravasalen Gerinnung. Stauung, Ödem und interstitielle Blutung sind die Folge. Innerhalb von Minuten bis Stunden münden die Prozesse in Zelltod und Transplantatverlust. Für die Nieren- und die Herztransplantation sind diese Vorgänge gut dokumentiert und lassen sich durch Blutgruppenmatching und Durchführung von Kreuzproben zwischen Spenderlymphozyten und Empfängerserum fast immer vermeiden (78, 114). Für die Lebertransplantation galt die hyperakute Abstoßung lange Zeit als nicht existent. Sie konnte erstmals in bestimmten Stammkombinationen in der Ratte induziert werden. Heute geht man davon aus, daß sie für die seltenen frühen Transplantatverluste nach initialer Funktionsaufnahme verantwortlich sind (60).

### 1.3.2. Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung ist die Hauptursache für den frühen Transplantatverlust. Sie ist definiert als eine früh nach der Transplantation auftretende, rasch verlaufende Transplantatdysfunktion immunologischer Genese. Dabei liegt oft eine Diskrepanz zwischen zellulärem Infiltrationsmuster und klinischem Verlauf vor. Für das Herz wird diese Form der Abstoßung nach dem Ort der Manifestation (vaskulär vs. interstitiell), nach dem Typ der immunologischen Infiltration (akut vs. chronisch) und nach dem angenommenen zugrundeliegenden Immunmechanismus (humoral vs. zellulär) eingeteilt (47, 50). Man unterscheidet chronisch-interstitielle Abstoßungen (häufigste Form, klassische zelluläre Abstoßung), akut-interstitielle Abstoßungen (gemischt humorale), chronisch-vaskuläre (zelluläre) und akut-vaskuläre (humorale) Formen. Die interstitiell-zelluläre Abstoßung ist durch das interstitielle Ödem und die Infiltration mit Lymphozyten, Lymphoblasten und Monozyten/Makrophagen charakterisiert. Bei Herztransplantaten liegen die Infiltrate perivaskulär und endokardial, bei schweren Episoden auch im Interstitium. Die hauptsächlich periportal liegenden Infiltrate in Lebertransplantaten gehen mit Gallengangsschädigung und Endothelialitis einher. Nierentransplantate zeigen diffus peritubuläre und intratubuläre Infiltrate (11, 64, 104, 130, 139).

### 1.3.3. Chronische Abstoßung

Die chronische Abstoßung ist definiert als graduell progrediente Einschränkung der Transplantatfunktion, in Abwesenheit anderer spezifischer Erkrankungen, die in der Regel nicht vor dem 6. -12. Monat nach Transplantation auftritt. Sie zeigt sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten und geht mit chronisch entzündlichen Veränderungen an den größeren Gefäßen und im Interstitium einher. Es kommt zu einer myointimalen Proliferation der Arterien und Arteriolen, im Sinne einer Transplantatvaskulopathie, mit schließlich signifikanter Lumeneinengung. Histologisch findet man eine relativ milde monoklonale Zellinfiltration mit Sklerosierung des Gewebes. Die chronische Abstoßung ist die häufigste Indikation zur Retransplantation. Sie äußert sich bei Herztransplantierten in Leistungsabfall, subfebrilen Temperaturen, leichtem RR-Abfall, Herzschattenvergrößerung im Röntgen-Thorax, eingeschränkter Ventrikelfunktion im Herzecho, Auftreten von Herzrhythmusstörungen und in zumeist stumm verlaufenden Myokardinfarkten. Im Koronarangio finden sich langstreckige Stenosen der Herzkranzgefäße als Korrelat der Transplantatvaskulopathie (159). Bei Nierentransplantierten zeigt sich ein Anstieg des Kreatinins im Serum und eine Proteinurie. Lebertransplantierte Patienten zeigen einen Anstieg des Bilirubins und der Transaminasen. Morphologisch zeigt sich in der Histologie oft das sog. „vanishing bile duct syndrome“ als Zeichen der chronischen Transplantatabstoßung nach erfolgter Lebertransplantation (47, 70, 71, 148). Pathogenetisch scheinen akute Abstoßungsepisoden für die spätere Entwicklung einer chronischen Abstoßung eine wesentliche Rolle zu spielen. Zudem werden primär nicht immunologische Aspekte diskutiert. Hierbei scheint besonders der sog. Ischämie-, bzw. Reperfusionsschaden von Bedeutung zu sein. Man vermutet, daß der initiale (v.a. intimale) Schaden, den das Transplantat während der Ischämiephase und der anschließenden Reperfusion nimmt, einen Anstoß für die chronische Abstoßung gibt (2, 83, 91, 148).

## 1.4. Wirkungsweise der verwendeten Immunsuppressiva

### 1.4.1. FK 506

FK 506 (Tacrolimus), ein Makrolid, inhibiert die T-Zell-Aktivierung auf ähnliche Weise wie CsA, ein wasserunlösliches, zyklisches Undekapeptid, das aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* gewonnen wird. Der jeweilige immunsuppressive Effekt basiert auf der

Komplexbildung des Wirkstoffs (CsA bzw. FK 506) mit dem entsprechenden intrazellulären, zytoplasmatischen Rezeptorprotein (Cyclophilin bzw. FK-bindendes Protein = FKBP) (32, 55, 86, 109, 133). Der Wirkstoff-Rezeptor-Komplex hemmt die Aktivierung einiger Transkriptionsfaktoren, z.B. von NF-AT und NF- $\kappa$ B, die für die Induktion der Synthese von Zytokinen in T-Lymphozyten notwendig sind. Hieran sind unter anderem die Hemmung der Proteinphosphat-Phosphatase Calcineurin, sowie die Blockierung der Signaltransduktion des Antigenrezeptors beteiligt. Der am stärksten betroffene Transkriptionsfaktor NF-AT kommt ausschließlich in T-Lymphozyten vor, was die starke T-Zell-Selektivität dieser Immunsuppressiva erklärt (146).

#### 1.4.2. Leflunomid und Malononitrilamid

Leflunomid (*N*-(4-Trifluoro-Methylphenyl)-5-Methylisoxazol-4-Carboxyamid) stellt eine Prodrug dar. Nach Applikation wird es im tierischen und menschlichen Organismus in den aktiven Metabolit, A77 1726 (2 Cyano-3-Hydroxy-*N*-(4-Trifluoromethylphenyl)Butamid), umgewandelt (130). Wie Brequinar Natrium hemmt Leflunomid die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHO-DH) und somit die de novo Pyrimidin-Synthese (154). Zudem entfaltet es seine Wirkung über eine Hemmung von verschiedenen Protein-Tyrosin-Kinasen (u.a. p56<sup>lck</sup> und p56<sup>fyn</sup>) (156). Außerdem werden eine Reihe weitere Wirkmechanismen diskutiert. Unter anderem soll Leflunomid über eine verstärkte Expression des „transforming growth factor“ TGF $\beta$  die B- und T-Zell-Proliferation und die Antikörperbildung unterdrücken (21, 111). Auch eine direkte Inhibition von T-Zell-abhängiger und T-Zell-unabhängiger B-Zell-Proliferation und Antikörperproduktion konnte für Leflunomid bereits nachgewiesen werden (97, 136).

In verschiedenen Tiermodellen diverser Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis (7) oder dem systemischen Lupus erythematodes (120), zeigte sich Leflunomid ebenfalls als hoch wirksam. Aufgrund der langen in vivo Halbwertszeit von Leflunomid scheint sein Einsatz in der Organtransplantation limitiert. Die zum Leflunomid-Hauptmetaboliten strukturanalogen Malononitrilamide könnten insbesondere unter diesem Gesichtspunkt besser geeignet sein (138). Ein Vertreter dieser Wirkstoffklasse, das MNA 715 soll im Rahmen der vorliegenden Dissertation auf sein4 immunsuppressive Potenz hin untersucht werden.

### 1.5. Eigene Fragestellung

Die Immunreaktion des Empfängerorganismus gegen das Transplantat stellt auch unter Verwendung potenter Immunsuppressiva die häufigste Komplikation dar und trägt zu der hohen Morbidität dieser Patienten in den ersten Monaten nach Transplantation bei. Unbehandelt führt die Abstoßung zum immunologischen Transplantatverlust. Therapierefraktäre Abstoßungen sind bei Herz- und Lebertransplantaten tödlich, wenn nicht rechtzeitig ein neues Organ für eine Retransplantation zur Verfügung steht. Bei Nierentransplantaten führt die Abstoßung zur erneuten Dialysepflicht. Das Hauptproblem bei Zweittransplantationen besteht in der erhöhten Abstoßungsrate, was auf eine Sensibilisierung nach der Ersttransplantation zurückzuführen ist. Mit den bisher klinisch etablierten immunsuppressiven Therapieschemata sind, nicht zuletzt durch den allgemein organschädigenden Effekt der Medikamente selbst (z.B. Nephrotoxizität des CsA) und durch die erhöhte Infektgefährdung im Rahmen der globalen Immunsuppression, keine optimalen Resultate zu erzielen. Die Entwicklung neuer Immunsuppressiva, mit neuartigen Wirkmechanismen, stellt demnach eine Möglichkeit dar, die derzeit gängigen Schemata der Immunsuppression nach Organtransplantation zu optimieren und in ihren Nebenwirkungen zu entschärfen. Unter diesem Gesichtspunkt erscheinen die Malononitrilamide als vielversprechende Wirkstoffklasse. Der Einsatz von Leflunomid im Menschen ist trotz nachgewiesener immunsuppressiver Wirkung, bei relativ geringer Toxizität und Nebenwirkungsrate, wegen der langen biologischen Halbwertszeit limitiert. Malononitrilamide, Analoga des Leflunomid-Hauptmetaboliten A77 1726, könnten aufgrund ihrer kürzeren Halbwertszeit für den Einsatz im Menschen besser geeignet sein (138).

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, das MNA 715 im Hinblick auf seine immunsuppressive Potenz in der Immunsuppression nach Transplantation, im Modell der heterotopen HTx in der Maus, zu untersuchen.

Ein für Leflunomide bereits beschriebener Synergismus mit FK 506 war ebenfalls Gegenstand dieser Dissertation.

Durch zusätzliche Gewinnung von in vitro Daten (Histologie, RNase Protection Assay (RPA)) sollte versucht werden, den möglichen Wirkmechanismus von MNA 715 zu ergründen.

## 2. Material und Methode

### 2.1. In vivo

#### 2.1.1. Tiermodell

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden Fragestellungen wurden in einem vollalloge- nen, heterotopen Herztransplantationsmodell in der Wildtypmaus bearbeitet. Dabei wurden die Spenderherzen heterotop an die großen infrarenalen Gefäße anastomosiert. Es handelt sich dabei um ein rein immunologisches Modell. Die Empfängermaus behält ihr eigenes Herz und ist somit nicht auf die Funktion des Transplantates angewiesen. Auch im Rahmen einer evtl. ablaufenden Abstoßungsreaktion gegen das Spenderorgan ist die Maus in ihrem Wohlbefinden nicht beeinträchtigt.

Weitere Unterschiede zur orthotopen HTx ergeben sich aus der Art der Gefäßanschlüsse. Der Truncus aorticus und die Arteria pulmonalis des Empfängerherzens werden dabei End-zu-Seit mit der Aorta abdominalis bzw. der Vena cava abdominalis des Empfängers anastomosiert. Der Blutfluß erfolgt dabei von der Aorta abdominalis des Spenders retrograd in den Truncus Aorticus des Transplantates. Unter Umgehung des linken Ventrikels gelangt das Blut dann direkt in die Koronargefäße. Über die Koronarvenen und den Sinus venosus fließt das Blut in den rechten Vorhof, von dort in den rechten Ventrikel und über die Arteria Pulmonalis in die Vena cava abdominalis des Empfängers. Das so perfundierte Transplantat beginnt ca. eine Minute nach Freigabe des Blutflusses selbständig zu schlagen.

#### 2.1.2. Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche waren gemäß Tierschutzgesetz von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) unter dem Aktenzeichen 211-2531-42/95 zuvor genehmigt worden.

#### 2.1.3. Tierspezies und Tierhaltung

Alle Versuche wurden an ingezüchteten weiblichen Mäusen im Alter von 8 bis 12 Wochen und einem Gewicht von 20 bis 25 Gramm durchgeführt. Als Transplantatempfänger dienten C57/BL6 Mäuse mit dem Haplotyp H<sup>2b</sup>. Als syngene Spender wurden Mäuse desselben Stammes verwendet. Als allogene Spender fungierten BALB/c Mäuse mit dem Haplotyp H<sup>2d</sup>

(vollarlogen zu den Empfängertieren in allen Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigenen). Die Mäuse wurden von Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die Tiere wurden in Macrolonkäfigen (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) auf Einstreu bei Preßfutter (Altromin 1324 Standard-Diät, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum im Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, gehalten.

#### 2.1.4. Anästhesie

Die Narkose wurde unter Verwendung von Äther (Diäthyläther zur Inhalationsnarkose, Fa. Asid Bonz, Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Die Maus wird dazu in ein Gefäß gesetzt, auf dessen Boden sich eine mit Äther getränkte Kompresse befindet. Nach ca. 30 Sekunden kann die narkotisierte Maus aus dem Gefäß entnommen werden. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie atmet die Maus ein Äther-Luft-Gemisch aus einem 15 ml Falconröhrchen ein, auf dessen Boden sich ebenfalls eine mit Äther getränkte Kompresse befindet. Die Narkosetiefe wird anhand der Bewegung der Schnurrbarthaare überwacht und durch Variation der Entfernung des Röhrchens von der Nasenspitze der Maus gesteuert. Nach Abschluß des Eingriffs wird das Röhrchen entfernt. Die Maus erwacht nach durchschnittlich 5 Minuten und beginnt rasch wieder mit der Nahrungsaufnahme.

#### 2.1.5. Operation

##### 2.1.5.1. Operationsinstrumentarium

- ◆ Operationsmikroskop mit bis zu zwölfacher Vergrößerung (OPMI-6, Fa. Carl Zeiss/Oberkochen, Deutschland)
- ◆ Übliches mikrochirurgisches Besteck (Nadelhalter, Knüpfpinzette, 2 Uhrmacherpinzetten, Vannasschere, Mikroschere, 2 gebogene Pinzetten)
- ◆ Mikrochirurgischer, bipolarer Gefäßkauter (Bipolar Kauter, Fa. Fischer Medizintechnik/Freiburg, Deutschland)
- ◆ 2 Biemerklappen (Biemer-Clip, Artikel Nr. FD 562, Aesculap-Werke AG, Tuttlingen, Deutschland)
- ◆ 7/0 Seide (Perma-Hand Seide, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)

- ◆ 10/0 monofiler Faden (Ethilon schwarz monofil 10/0, doppelt armiert, BV-4, Bestell-Nr. EH 7509, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- ◆ 5/0 Ethilon Faden (Ethilon schwarz monofil 5/0, Bestell-Nr. 1666, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- ◆ kardioplege Lösung nach Brettschneider (HTK, Köhler Chemie, Alsbach, Deutschland)
- ◆ 0,9% NaCl-Lösung
- ◆ Korkplatte 20x30 cm
- ◆ Handelsübliche Lösung zur Hautdesinfektion (Cutasept<sup>®</sup> F, Hautdesinfiziens farblos, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland)

### 2.1.5.2. Das Modell der heterotopen Herztransplantation in der Maus

#### 2.1.5.2.1. Spenderoperation und Transplantatpräparation

Die Anästhesie der Spendermaus erfolgt wie unter 2.1.4. beschrieben. Die Maus wird mit Pflasterstreifen in Rückenlage auf einer Korkplatte fixiert. Nach Desinfektion des Brust- und Bauchbereichs erfolgt eine mediane Laparotomie vom Sternum bis nahe der Symphyse. Der Darm wird vorsichtig nach rechts ausgelagert, das Retroperitoneum wird stumpf - unter Zuhilfenahme zweier Wattestäbchen - eröffnet. Die Aorta abdominalis wird aufgesucht, mit einer 27G Kanüle punktiert und die Maus entblutet. Es folgt die Thorakotomie durch Schnitte in beiden Axillarlinien. Das Diaphragma wird scharf vom Rippenbogen abgesetzt. Die ventrale Thoraxwand kann nun nach kranial hochgeklappt werden, die Sicht auf Herz und Lunge ist somit frei. Zur Spülung der Herzens wird die suprahepatische Vena cava inferior mit einer 27G Kanüle punktiert. Durch Injektion von ca. 0,5 ml kardiopleger Lösung nach Brettschneider wird das rechte Herz direkt, das linke Herz und die Koronargefäße indirekt über die Lunge gespült. Nach stumpfer Präparation des Thymus und der Nervi phrenici werden beide unter Mitnahme des mediastinalen Fettgewebes entfernt. Beide Lungenhili werden mit 7/0 Seide ligiert und beide Lungen scharf, knapp distal der Ligatur abgesetzt. Nach Ligatur (7/0 Seide) und Durchtrennung von Vena cava superior, Vena cava inferior und Vena hemiazygos kann das Herz scharf entlang des Ösophagus abpräpariert werden.

Ex situ erfolgt die Präparation der Gefäßstümpfe. Arteria pulmonalis und Truncus aorticus werden mit einer gebogenen Pinzette unterfahren und mit einer mikrochirurgischen Schere herzfern durchtrennt, um möglichst lange Gefäßstümpfe zu erhalten. Die Explantation ist mit

diesem Schritt beendet, das Herz wird bis zur Implantation in 4°C kalter kardiopleger Lösung nach Brettschneider aufbewahrt.

#### 2.1.5.2.2. Empfängeroperation

Anästhesie, Fixierung auf dem Korkbrett und mediale Laparotomie erfolgen wie bei der Spenderoperation. Der Darm wird nach rechts aus dem Abdomen ausgelagert und für die Dauer der Operation in eine mit 0,9% NaCl getränkten Kompresse eingeschlagen. Das Retroperitoneum wird wie beim Spender stumpf eröffnet. Die großen abdominalen Gefäße werden sorgfältig vom Abgang der Nierengefäße bis zur Aortenbifurkation freipräpariert. Dabei werden paraaortale Lymphgefäße und nach dorsal abgehende Lumbalgefäße elektrisch koaguliert. Die Aorta abdominalis und die Vena cava abdominalis können nun distal der Nierengefäße und proximal der Aortenbifurkation mit Biemer-Klemmchen ausgeklemmt werden. Die Aorta wird in Längsrichtung mit einer Vannasschere aufgeschnitten und mit 0,9% NaCl gespült. Durch je einen Eckstich am proximalen und distalen Ende der Inzision in die Aorta wird der Truncus aorticus des Spenderorgans End-zu-Seit an der Aorta des Empfängers fixiert. Anschließend wird die Anastomose fortlaufend mit 10/0 Ethilon genäht. In gleicher Weise erfolgt die Anastomose des Truncus pulmonalis des Spenderherzens mit der Vena cava abdominalis. Nach Entfernen der Klemmen und Reperfusion beginnt das Spenderherz rasch zu schlagen. Eine rosige Färbung und schnelles Einsetzen der Kontraktionen im Sinusrhythmus belegen eine gelungene Transplantation. Das Herz wird anschließend von Trachea- und Fadenresten gesäubert. Während der gesamten Operation wird es regelmäßig mit 0,9% NaCl betropft und so feucht gehalten. Der Darm kann nun wieder in das Abdomen rückverlagert werden. Nach fortlaufender Naht der Bauchmuskulatur und kutaner Einzelknopfnah (beides mit 5/0 Ethilon) ist die Transplantation beendet.

Die Maus erwacht ca. 5 Minuten nach Entfernen des Ätherröhrchens aus der Narkose. Für 30 Minuten wird sie auf einer Wärmeplatte gehalten und bekommt postoperativ Tramaltropfen zur Schmerzprophylaxe ins Trinkwasser.

#### 2.1.5.2.3. Transplantatentnahme

Zu unterschiedlichen Zeiten nach Transplantation (Tag 5, 15, 30, 100 und nach Abstoßung) wurden das Transplantat und das native Herz entnommen.

Zunächst erfolgen Anästhesie, mediale Laparotomie und Auslagerung des Darms wie bei der Spenderoperation. Das Transplantat wird nun makroskopisch in situ auf Abstoßungszeichen, Kontraktilität und lokale Infektionszeichen hin untersucht. Es folgt die Thorakotomie wie bei der Spenderoperation. Die thorakale Vena cava inferior wird scharf durchtrennt und die Maus so entblutet. Nach Absaugen des Blutes mit einer 1 ml Tuberkulinspritze wird das native Herz scharf aus dem Thorax herauspräpariert, das Transplantat scharf entlang der Anastomosen aus dem Abdomen entfernt. Die Vorhöfe der geernteten Organe werden verworfen, der Rest wird geteilt. Ein Teilstück wird direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum RNase Protection Assay bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Das zweite Teilstück wird in ein Plastikschildchen gegeben, mit Gefriermedium (Jung Tissue freezing medium, Leica instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) übergossen und für ca. 10 Sekunden in Isomethylbutan (2-Methylbutan, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) getaucht, welches durch flüssigen Stickstoff gekühlt ist. Die so erzeugten Gefrierblöcke werden bis zur weiteren Bearbeitung (Histologie) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 2.1.6 Medikation

### 2.1.6.1. Immunsuppression mit FK 506

Nach erfolgter HTx wurde ein Teil der Mäuse mit dem etablierten Immunsuppressivum FK506 (Fujisawa Deutschland GmbH, München, Deutschland) therapiert. FK 506 (Tacrolimus) wird heute als Basisimmunsuppressivum bei der Leber- und Nierentransplantation und in der „Rescue Therapie“ bei Steroid- und ATG/OKT 3-resistenter Abstoßung unter CsA eingesetzt. Der Wirkmechanismus von FK 506 wurde unter 1.5.1.bereits dargestellt. Die Applikation von FK 506 erfolgte mittels einer 1 ml Tuberkulinspritze, subcutan unter eine nuchale Hautfalte der Tiere. Die benötigte Dosis FK 506 wurde hierzu in 0,1 ml 0,9% NaCl suspendiert. Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung wurden Dosen von 0,5 bis 3 mg/kg/die bis zum Abstoßungszeitpunkt bzw. bis zum 20. postoperativen Tag verabreicht.

### 2.1.6.2. Immunsuppression mit MNA 715

Das MNA 715 wurde in Pulverform von der Firma Hoechst (Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland) zur Verfügung gestellt und mußte vor

Applikation aufsuspendiert werden. Zur Herstellung dieser Suspension wurde eine 1%ige Carboxymethylcellulose-(CMC)-Lösung angesetzt. Dazu wurden 10 g eines CMC-Natrium-Salzes (Fulka Chemie AG, CH-9470 Buchs, Schweiz, Bestell-Nr. 21904) in 1000 ml sterilem Aqua destillata gelöst. MNA 715 wurde dann so angesetzt, daß die benötigte Dosis für eine Applikation in 0,1 ml Suspension enthalten war. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- ◆ Das MNA 715-Pulver in ein 50 ml Blue cap geben.
- ◆ Die vorbereitete 1%ige CMC zugeben.
- ◆ Pro 5 ml CMC 15 µl Tween 80<sup>®</sup> (Riedel de Haen, D-30918 Seelze, Deutschland, Bestell-Nr. 63161) hinzufügen.
- ◆ Den gesamten Ansatz gut vortexen und für 5 Minuten unter einem Ultraschallstab homogenisieren.
- ◆ Alequots der benötigten Tagesration erstellen und bei -20°C bis zur Applikation aufbewahren.
- ◆ Zur Verwendung die Alequots auftauen und nochmals gut vortexen.

MNA 715 wurde über den gleichen Zeitraum wie FK 506 appliziert, allerdings nicht s.c. sondern oral. Hierzu wurde eine 22G starke Plastiksonde dem Tier schmerzfrei in den Ösophagus eingeführt. Auch für MNA 715 wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt. Hierzu wurde Dosen von 5 bis 30 mg/kg/die verwendet.

#### 2.1.6.3. Kombinierte Immunsuppression

Um eine mögliche additive oder synergistische Wirkung von MNA 715 und FK 506 nachzuweisen, wurden einige Mäuse mit einer kombinierten Immunsuppression aus MNA 175 und FK 506 behandelt. Die Applikation der Einzelsubstanzen erfolgte dabei wie bei der Monotherapie (MNA 715 p.o. und FK 506 s.c.). Die in der Kombinationstherapie verwendeten Dosen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

#### 2.1.6.4. Allgemeine Medikation

Zur perioperativen Infektionsprophylaxe (Tag 0 bis 5 post HTx) wurden 3mg/kg/die Ciprobay 400<sup>®</sup> in 0,5 ml 0,9% NaCl mit einer 1 ml Tuberkulinspritze i.p. verabreicht.

Zur Schmerztherapie wurden Tramaltropfen postoperativ im Trinkwasser angeboten.

### 2.1.7. Transplantatmonitoring in der Maus

Ergebnisse aus anderen Arbeiten unserer Forschungsgruppe, die sich ebenfalls des Modells der heterotopen HTx in der Maus bedienten, konnten zeigen, daß die Fingerpalpation der Echokardiographie und der diagnostischen Laparotomie gleichwertig ist (Stefan Meier, Daten nicht gezeigt). Um die Belastung für die Versuchstiere möglichst gering zu halten, wurde darauf verzichtet, positive Palpationsergebnisse routinemäßig zu verifizieren. Nur bei fraglich positivem oder eindeutig negativem Palpationsbefund wurde dieser durch diagnostische Laparotomie bestätigt.

#### 2.1.7.1. Fingerpalpation

Zum täglichen Monitoring der Transplantatfunktion wurde die Maus durch Griff an Nackenfell und Schwanz in der linken Hand des Untersuchers fixiert. Zwischen Daumen und Zeigefinger der rechten Hand kann das Herz nun in der Flanke des Tieres palpirt werden. Leichte Abstoßung manifestiert sich in Verhärtung des Transplantats, finale Abstoßung durch fehlende Herzaktion.

#### 2.1.7.2. Diagnostische Laparotomie

Zur diagnostischen Laparotomie wird die Maus wie beschrieben mittels Äther narkotisiert und einer medialen Laparotomie unterzogen. Bei fehlender Kontraktion erfolgt noch in Narkose die Explantation von nativem und transplantiertem Herz bzw. die schmerzfreie Opferung durch Herzschnitt. Bei Nachweis von Kontraktionen wird das Abdomen in gleicher Weise verschlossen wie bei der ursprünglichen Transplantation. Grundsätzlich wurde jeder Abstoßungszeitpunkt durch diagnostische Laparotomie gesichert.

## 2.2. Ex vivo

### 2.2.1. Histologische Untersuchungen der Transplantate

Alle histologischen Untersuchungen wurden an 2 und 5  $\mu\text{m}$  dicken Gefrierschnitten der geernteten Organe durchgeführt. Dazu wird das Organ unmittelbar nach Explantation in zuvor bereitgestellte Kunststoffschälchen gelegt, mit Einbettmedium (Jung, Tissue freezing medium<sup>®</sup>, Leica instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) übergossen und für ca. 10 Sekunden in Isomethylbutan (2-Methylbutan, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) getaucht, das durch flüssigen Stickstoff gekühlt wird. Die so gewonnenen Gefrierblöcke wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Anfertigung der Schnitte wurden die gefrorenen Blöcke bei einer Kammertemperatur von  $-23^{\circ}\text{C}$  im Kryostat (Leitz KG, München) auf dem Schneidetisch fixiert und 2  $\mu\text{m}$  (van Gieson-Färbung) und 5  $\mu\text{m}$  (HE-Färbung und Immunhistologie) dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht, für ca. 1 Stunde luftgetrocknet, azetonfixiert und bis zur Färbung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.1.1. Konventionelle Histologie

Für die Weiterbearbeitung wurden die Schnitte aufgetaut, luftgetrocknet und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) (Merk, Darmstadt) und nach Elastica-van-Gieson mit Hämatoxylin-Säurefuchsin-Pikrinsäure gefärbt. Die HE-Färbung stelle das Zytosol rot und die Zellkerne bläulich bis lila dar, was eine Aussage über die Stärke einer evtl. Infiltration ermöglicht. Die HE-Färbung war auch Grundlage der Klassifikation des Grades der Abstoßung nach Billingham. Die van-Gieson-Färbung stellt kollagene Fasern rot, das restliche Gewebe bräunlich dar. Sie wurde dazu verwendet, den Grad des kollagenen Umbaus der Transplantate zu quantifizieren.

#### 2.2.1.2. Immunhistologische Färbung

Für die immunhistologischen Färbungen wurden monoklonale Antikörper (mAb) verwendet. Dabei wurde die sog. indirekte Färbung durchgeführt, d.h. ein Erstantikörper bindet spezifisch an seinem Epitop. Anschließend wird ein Zweitantikörper aufgebracht, der zum einen Peroxidase-konjugiert ist und zum anderen am Erstantikörper bindet. Nach diversen

Zwischenschritten, die in erster Linie dem Auswaschen von überschüssigen Antikörpern dienen und so unspezifische Färbereffekte verhindern sollen, werden die Schnitte in die Substratlösung gegeben. Die am Zweitantikörper gebundene Peroxidase setzt nun das Substrat um, was zu einer rötlich bis bräunlichen Färbung an der entsprechenden Stelle führt.

Im einzelnen wurden folgende Strukturen gefärbt:

- ◆ Gr-1<sup>\*</sup> (färbt Granulozyten)
- ◆ Mac-1<sup>\*\*</sup> (färbt spezifisch für Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen)
- ◆ CD4<sup>\*\*</sup> (färbt CD4+ T-Zellen)
- ◆ CD8<sup>\*\*</sup> (färbt CD8+ T-Zellen)

\* Ratte-anti-Maus mAb (Pharmlingen, Hamburg, Deutschland)

\*\* Ratte-anti-Maus mAb (Hybridom, American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA)

Als Zweitantikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter F(ab')<sub>2</sub> Fragment Maus-anti-Ratte IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet.

### 2.2.1.3. Klassifikation der Abstoßung nach Billingham

Der Grad der Abstoßung der einzelnen Organe wurde in Anlehnung an die, für die HTx international übliche Klassifizierung der akuten Abstoßung nach Billingham eingeteilt (11, 53). Diese wurde ursprünglich an endomyokardialen Biopsien entwickelt, bei denen nur wenig Material zur Verfügung steht. Im vorliegenden Fall stellen die Schnitte aber immer Querschnitte durch das gesamte Organ dar. Daher existiert bei uns kein Grad 2 nach Billingham (= unifokales, aggressives Infiltrat +/- fokaler Myolyse). Es wurde in keinem Organ genau ein Infiltrat gefunden (52). Die Klassifikation nach Billingham unterscheidet folgende Grade der Abstoßung:

- ◆ Grad 0: Keine Abstoßung
- ◆ Grad 1A: Fokale geringe Infiltration (perivaskulär oder interstitiell, ohne

## Myozytolyse)

- ◆ Grad 1B: Diffuse, geringe Infiltration ohne Myozytolyse
- ◆ Grad 2: Unifokale aggressive Infiltrate und/oder fokale Myozytolysen (nur bei Biopsien)
- ◆ Grad 3A: Multifokale aggressive Infiltrate und/oder fokale Myozytolysen
- ◆ Grad 3B: Diffuser Entzündungsprozeß mit Myozytolysen
- ◆ Grad 4: Diffuse Schädigung mit ausgeprägten Myozytolysen, evtl. auch Ödem, Hämorrhagie und Vaskulitis

## 2.2.2. RNS-Isolierung

Zur Konservierung für die spätere RNS-Isolierung wurden die Herzen unmittelbar nach Explantation in ein Eppendorf-Cup gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bei der RNS-Isolierung wurde in Anlehnung an die Methode von Chomczynski und Sacchi verfahren (28, 29). Hierzu wurde ein spezielles Reagenz, das sog TRI-Reagenz (Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO, U.S.A., 43178-9974, Bestell-Nr. T-9424) verwendet. Das Reagenz enthält Phenol und Guanidin-Thiocyanat. Zur RNS-Isolierung wird das entsprechende Gewebe (im vorliegenden Fall das transplantierte Mausherz) im Reagenz homogenisiert und nach Zusatz von Chloroform zentrifugiert. Auf diese Weise erhält man drei Flüssigkeitsphasen, welche im wesentlichen eine RNS-, eine DNS- und eine Proteinphase darstellen. Der Vorteil dieser Methode besteht v.a. in der einfachen und schnellen Durchführbarkeit. Die vergleichsweise geringe Anzahl der Einzelschritte führt zu einer sehr hohen RNS-Ausbeute, bei gleichzeitig geringerer Verunreinigung und weniger Fehlerquellen, die zur Degeneration der RNA führen könnten.

Die RNS-Isolierung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- ◆ Gefrorenes Organ in 1 ml TRI-Reagenz aufnehmen.
- ◆ Ca. 30 Sekunden mixen, um eine möglichst homogene Zerkleinerung des Organs zu erreichen.
- ◆ 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- ◆ 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zugeben und gut vortexen.
- ◆ 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

- ◆ 15 Minuten bei 4°C und Maximalgeschwindigkeit zentrifugieren.
- ◆ Es bilden sich 3 Phasen:
  - ◆ Rote Phase = Organphase am Grund des Cups (= Proteinphase)
  - ◆ Farbloser Überstand = RNS-Phase
  - ◆ Dazwischen sog. Interphase = DNS-Phase
- ◆ Farblosen Überstand abnehmen und 500 µl Isopropanol zugeben.
- ◆ 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- ◆ 10 Minuten bei 4°C und Maximalgeschwindigkeit zentrifugieren.
- ◆ Es bildet sich ein Pellet am Grund des Cups.
- ◆ Überstand verwerfen.
- ◆ 1 ml 75% Ethanol zugeben und gut vortexen.
- ◆ 5 Minuten bei 4°C und 7500 U/min zentrifugieren.
- ◆ Überstand verwerfen.
- ◆ Pellet 5 – 10 Minuten unter dem Abzug lufttrocknen.
- ◆ 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O zugeben.
- ◆ Pellet 10 Minuten bei 55 –60°C auflösen.
- ◆ Gut vortexen.

Die so gewonnene RNS wird nach üblicher photometrischer Vermessung in 10µg RNS-Portionen aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80°C gelagert.

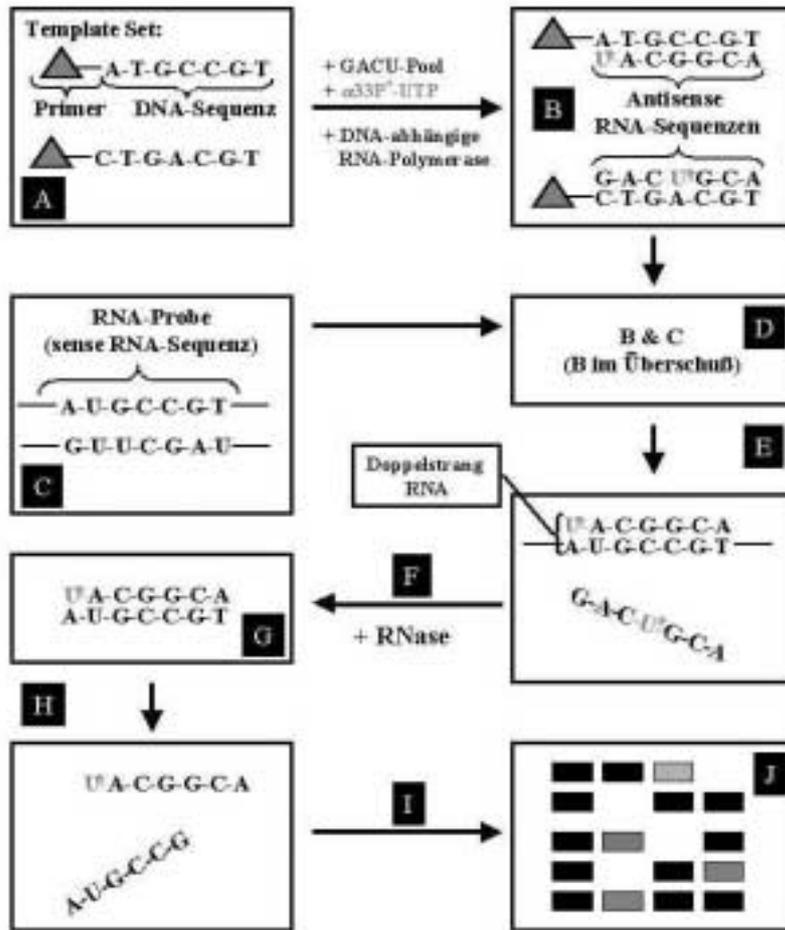
Je nach Probengröße konnten mit der beschriebenen Methode pro Herz 40 bis 120µg RNA, mit Quotienten (260/280nm) von 1,7 bis 1,8 gewonnen werden.

### 2.2.3. Das Ribonuklease Protektion Assay (RNase Protection Assay , RPA)

Für die Durchführung des RPA wurde der Riboquant<sup>TM</sup> Kit (Pharmingen, San Diego, USA) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Das RPA stellt eine sehr sensitive und hoch spezifische Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von RNS dar. Das exakte Protokoll würde den Rahmen dieser Dissertation sprengen. Diesbezüglich wird auf die Produktmonographie der Firma Pharmingen verwiesen (Instruction Manual, 5<sup>th</sup> Edition, April 1998, RiboQuant<sup>®</sup>, Multi-Probe RNase Protection Assay System).

Abb. 1 zeigt den schematischen Ablauf eines RPA. Ausgangspunkt stellt zunächst ein fertig vorliegendes Template-Set dar (A). Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus DNS-

Sequenzen (Matrizen = Templates) unterschiedlicher Länge, die für bestimmte Proteine kodieren und an deren Ende ein sog. Promotor gebunden ist. Zu diesem Template Set werden nun im Überschuß die vier Kernbasen Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil in Form ihrer Triphosphate gegeben (GACU-Pool). Zusätzlich wird noch mit  $\alpha^{33}\text{P}$  markiertes Uracil-Tri-Phosphat ( $\alpha^{33}\text{P}^*$ -UTP) zugegeben und anschließend eine DNS-abhängige RNS-Polyme-



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des RNase Protection Assay

rase eingebracht. Diese bindet an den Promotor, der an die DNS-Matrizen gebunden ist und polymerisiert zu den DNS-Templates antisense RNS. Ist die gesamte DNS-Matrize in RNS umgeschrieben, so beginnt der Vorgang von neuem, so lange, bis er terminiert wird. Auf diese Weise erhält man antisense, mit  $\alpha^{33}\text{P}^*$  markierte RNS-Sequenzen im Überschuß (B). Diese werden nun zusammen mit der aus den Herzen extrahierten RNS (C) über Nacht inkubiert. So entstehen RNS Hybride, d.h. RNS die z.T. in Einzelstrangform, an den zur markierten antisense RNS korrelierenden Stellen in Doppelstrangform vorliegt (E). Diese doppelsträngigen RNS-Abschnitte sind nun vor dem folgenden Verdau durch zugesetzte RNase (F) geschützt und überstehen diesen (G). Durch Erhitzen können diese Doppelstränge nun aufgespalten (H) und mittels Elektrophorese, in einem Polyakrylamidgel nach ihrer Sequenzlänge aufgetrennt werden (I). Im Gel entsteht so ein Bandenmuster, das via Autofluoreszenz oder Phosphorimaging ( $\alpha^{33}\text{P}^*$ -markierte antisense RNS) entwickelt und so sichtbar gemacht werden kann. Man erhält ein spezifisches Bandenmuster (J), das nun nach Bandenlage und -dichtigkeit ausgewertet werden kann. Auf

diese Weise kann die ursprünglich in der Probe vorgelegene RNS sowohl qualitativ als auch quantitativ beurteilt werden. Es ist jedoch zu beachten, daß es sich um keinen direkten, sondern um einen indirekten RNS- Nachweis über die  $\alpha^{33}\text{P}^*$  markierte und zur Probe antisensen RNS handelt.

### 2.3. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem t-Test. Das Sigifikanzniveau lag bei 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### 2.4. Gruppeneinteilung

In jeder Gruppe wurden initial 6 Mäuse zur Erstellung der Transplantat-Überlebenskinetik operiert. Zusätzlich wurden am 5. und 15. postoperativen Tag aus den Kontrollgruppen und aus den nach Auswertung der Kinetik „optimal“ therapierten Gruppen je 3 Mäuse explantiert. Je nach Ergebnis wurde in den einzelnen Gruppen die Versuchszahl erhöht bzw. am 30. und 100. postoperativen Tag Organe explantiert, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu verbessern. In anderen Gruppen wurde auf die Durchführung einzelner Versuche verzichtet, da keine neue Aussage zu erwarten war.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die operierten Gruppen:

\* *Therapiedauer: post Transplantation bis Abstoßung*

\*\* *Therapiedauer: post Transplantation bis Tag 20*

\*\*\* *Therapiedauer: post Transplantation bis Tag 6*

(+) *Tod der Tiere infolge therapiebedingter Nebenwirkungen*

n.d. *nicht durchgeführt*

n.m. *nicht möglich, d.h. in den Gruppen konnte ein Überleben der Transplantate über den entsprechenden Zeitraum nicht gesichert werden*

I *1 mg/kg/die FK 506 und 10 mg/kg/die MNA 715*

II *1 mg/kg/die FK 506 und 20 mg/kg/die MNA 715*

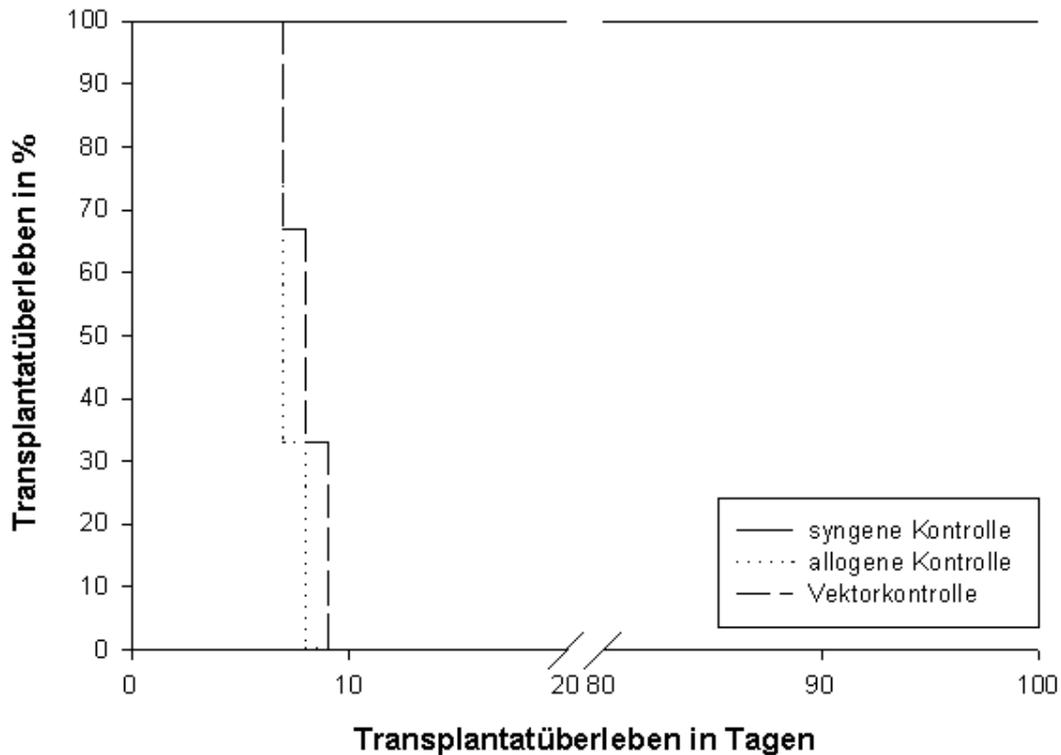
**Tab. 1:** Gruppenübersicht

Gruppe:	Spender :	Empfänger:	Therapie:	Kinetik: n=	Ex nach 5d N=	Ex nach 15d: n=	Ex nach 30d: n=	Ex nach 100d: n=	Summe: n=
Syngene Kontrolle	C57BL/6	C57BL/6	Keine	6	2	2	0	2	12
Allogene Kontrolle	BALB/c	C57BL/6	Keine	6	2 und 2x Ex n. 7d	n.m.	n.m.	n.m.	10
CMC Kontrolle	BALB/c	C57BL/6	0,1 ml 1%CMC/ die	3	n.d.	n.m.	n.m.	n.m.	3
Allogen 5 mg/kg/die MNA 715	BALB/c	C57BL/6	5 mg/kg/die MNA 715*	6	n.d.	n.m.	n.m.	n.m.	6
Allogen 10 mg/kg/die MNA 715	BALB/c	C57BL/6	10 mg/kg/die MNA 715*	6	n.d.	n.m.	n.m.	n.m.	6
Allogen 20 mg/kg/die MNA 715	BALB/c	C57BL/6	20 mg/kg/die MNA 715 ***	5	n.d.	n.d.	n.m.	n.m.	5
Allogen 20 mg/kg/die MNA 715	BALB/c	C57BL/6	20 mg/kg/die MNA 715 **	10	4	4	4	3	25
Allogen 30 mg/kg/die MNA 715	BALB/c	C57BL/6	30 mg/kg/die MNA 715* (+)	3	n.d.	n.m.	n.m.	n.m.	3
Allogen 0,5 mg/kg/die FK 506	BALB/c	C57BL/6	0,5 mg/kg/die FK 506*	6	n.d.	n.m.	n.m.	n.m.	6
Allogen 1 mg/kg/die FK 506	BALB/c	C57BL/6	1 mg/kg/die FK 506*	6	n.d.	n.d.	n.m.	n.m.	6
Allogen 3 mg/kg/die FK 506	BALB/c	C57BL/6	3 mg/kg/die FK 506***	6	n.d.	n.d.	n.m.	n.m.	6
Allogen 3 mg/kg/die FK 506	BALB/c	C57BL/6	3 mg/kg/die FK 506**	6	4	4	n.m.	n.m.	14
MNA 715 und FK 506 (I)	BALB/c	C57BL/6	(I) Siehe Legende	5	n.d.	n.m.	n.m.	n.m.	5
MNA 715 und FK 506 (II)	BALB/c	C57BL/6	(II) Siehe Legende (+)	4	n.d.	n.m.	n.m.	n.m.	4

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Beeinflussung der Transplantatabstoßung in vivo

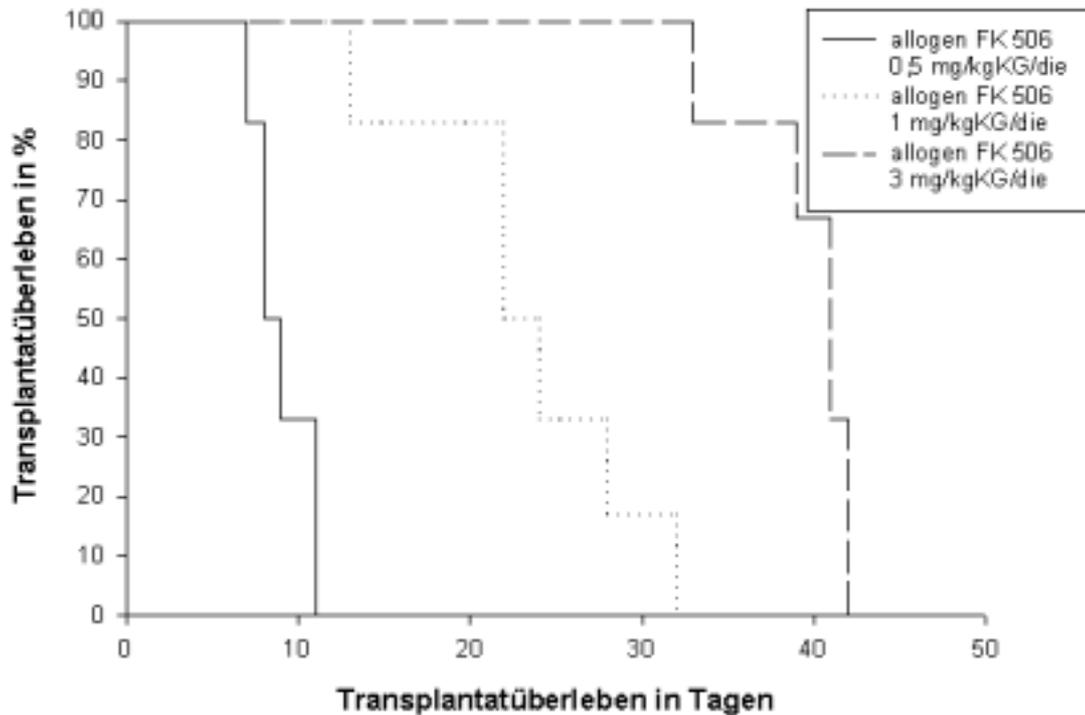
##### 3.1.1. Transplantatüberleben in den Kontrollgruppen



**Abb. 2:** *Transplantatüberleben in den Kontrollgruppen*

In Abbildung 2 ist zu erkennen, daß in der syngenen Kontrollgruppe (HTx C57BL/6 → C57BL/6) bei allen Tieren indefinitives Transplantatüberleben (>100 Tage) erzielt werden konnte (n=6). Herzen von vollallogenen Spendern (HTx BALB/c → C57BL/6) werden nach 7 bis 9 Tagen (allogene Kontrolle, n=6, mittleres Transplantatüberleben  $7,5 \pm 0,85$  Tage) abgestoßen. Die Applikation von 0,1 ml/kg/die 1%CMC alleine führt zu keiner Verlängerung des Organüberlebens. In dieser Gruppe wurden die Herzen ebenfalls nach 7 bis 9 Tagen abgestoßen (Vektorkontrolle, n=3, mittleres Transplantatüberleben  $8 \pm 1$  Tage).

## 3.1.2. Transplantatüberleben unter Immunsuppression mit FK 506

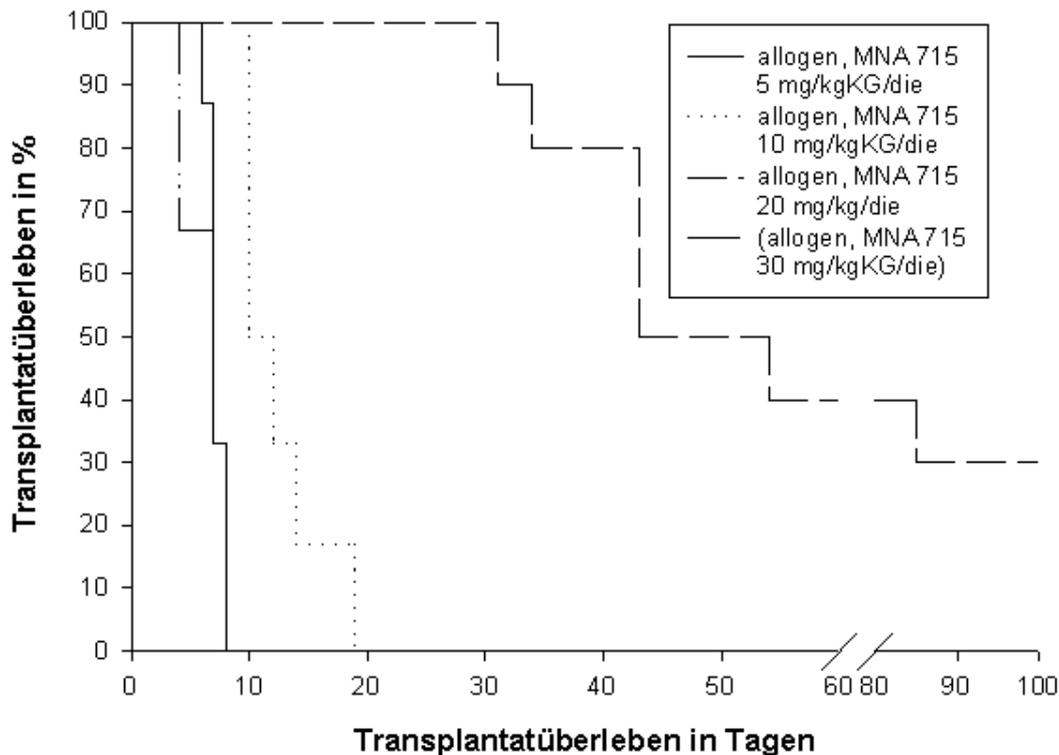


**Abb. 3:** *Transplantatüberleben unter Immunsuppression mit FK 506*

Um das neue Immunsuppressivum MNA 715 bezüglich seiner Wirksamkeit einordnen zu können, wurde zuerst eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für das bereits etablierte FK 506 ermittelt. FK 506 wurde in Dosen von 0,5 bis 3 mg/kg/die appliziert. Abbildung 3 zeigt die Überlebenskinetik für FK 506. Eine Dosis von 0,5 mg/kg/die, verabreicht über einen Zeitraum von 7 Tagen (Tag 0 bis 6 post HTx) erwies sich dabei als subtherapeutisch. Das mittlere Organüberleben betrug  $9 \pm 1,67$  Tage ( $n=6$ ). 1 mg/kg/die konnte, bei einer angestrebten Therapiedauer von 21 Tagen (Tag 0 bis 20 bzw. Tag der Abstoßung), das Transplantatüberleben zwar verlängern, jedoch nicht sicher für den Zeitraum der Therapie gewährleisten. Die Abstoßung erfolgte in dieser Gruppe nach 13 bis 28 Tagen ( $n=6$ , mittleres Organüberleben  $23,5 \pm 6,44$  Tage). Erst mit einer Dosis von 3 mg/kg/die konnte zu 100% Transplantatüberleben für den Zeitraum der Therapie (21Tage) erzielt werden. Die Herzen wurden in dieser Gruppe nach 33 bis 42 Tagen abgestoßen ( $n=6$ , mittleres Organüberleben  $39,7 \pm 3,44$  Tage). In keinem Fall konnte durch eine zeitlich limitierte Gabe von FK 506 indefinitives Transplantatüberleben ( $>100$  Tage) erreicht werden.

### 3.1.3. Transplantatüberleben unter Immunsuppression mit MNA 715

Wie für FK 506 wurde auch für MNA 715 eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt. Abbildung 4 stellt die daraus gewonnenen Ergebnisse graphisch dar.



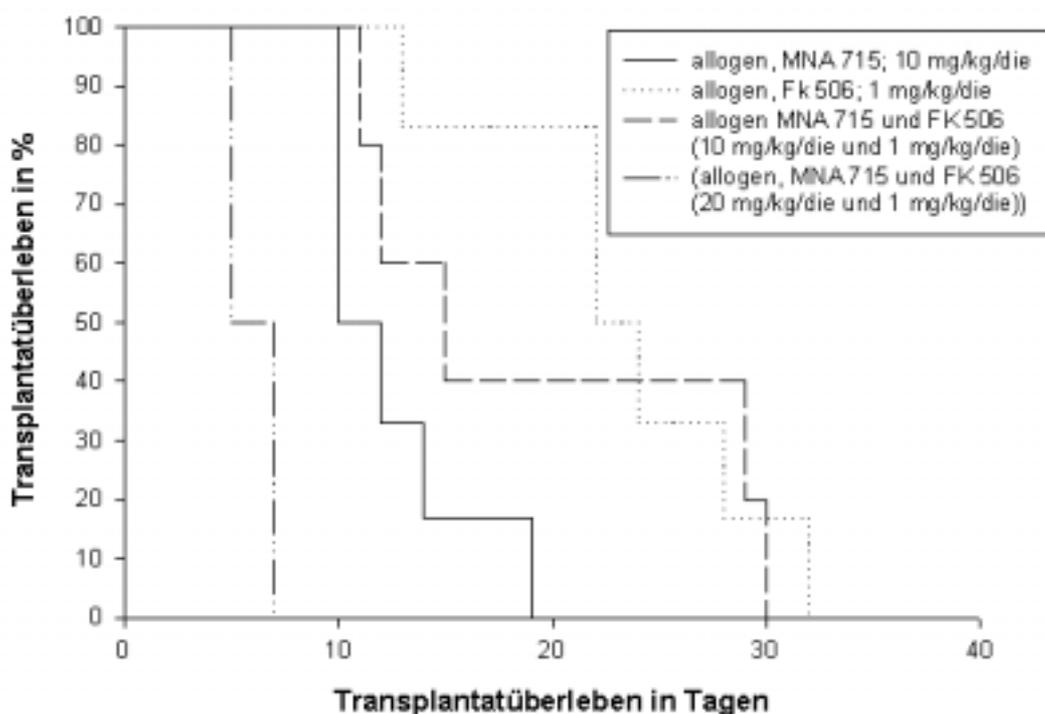
**Abb. 4:** Transplantatüberleben unter Immunsuppression mit MNA 715

Mit einer Dosis von 5 mg/kg/die MNA 715 konnte das Transplantatüberleben nicht verlängert werden. Die Herzen wurden nach 6 bis 8 Tagen ( $n=6$ , mittleres Organüberleben  $7,2 \pm 0,75$  Tage) abgestoßen. 10 mg/kg/die MNA 715 konnten das Überleben der Organe zwar verlängern, in keinem Fall jedoch die Abstoßung für die angestrebte Therapiedauer von 21 Tagen (Tag 0 bis 20 post HTx) verhindern. Die Abstoßung erfolgte nach 10 bis 19 Tagen ( $n=6$ , mittleres Organüberleben  $12,5 \pm 3,56$  Tage). Mit einer Tagesdosis von 20 mg/kg/die konnte die Abstoßung sicher für den Zeitraum der Therapie verhindert werden. Die Organe wurden nach frühestens 31 Tagen abgestoßen. In 30% der Tiere konnte mit dieser Dosierung sogar indefinitives Organüberleben ( $>100$  Tage) erreicht werden. Mit MNA 715 ließ sich also, im Gegensatz zu FK 506, durch zeitlich begrenzte Applikation indefinitives Organüberleben erzielen. Der Versuch den Prozentsatz der indefinitiv überlebenden Organe durch Steigerung der Tagesdosis auf 30 mg/kg/die zu erhöhen, scheiterte am Ableben der

Tiere nach 4 bis 8 Tagen infolge therapiebedingter Nebenwirkungen ( $n=3$ , mittleres Überleben der Mäuse  $6,3 \pm 2,08$  Tage). Im Verlauf der Therapie wurden diese Mäuse zunehmend kachektisch, blasser und waren in ihrer Reaktion deutlich verlangsamt. Die Sektion dieser Tiere post mortem zeigte multiple Ulzera im Magen-Darm-Trakt. Die von uns ermittelte Optimaldosis von 20 mg/kg/die wurde dagegen von allen Tieren gut vertragen.

#### 3.1.4. Transplantatüberleben unter kombinierter Immunsuppression

Um einen potentiellen Synergismus zwischen FK 506 und MNA 715 zu untersuchen, wurden einige Mäuse mit einer kombinierten Immunsuppression aus FK 506 und MNA 715 therapiert. Abbildung 5 zeigt die dabei gewonnenen Ergebnisse.



**Abb. 5:** Transplantatüberleben unter Kombinationstherapie mit MNA 715 und FK 506

Bei Kombination von 10 mg/kg/die MNA 715 und 1 mg/kg/die FK 506 konnte im Vergleich zur Monotherapie mit der jeweiligen Einzelsubstanz kein verlängertes Transplantatüberleben erzielt werden. Das mittlere Organüberleben betrug  $19,4 \pm 9,34$  Tage ( $n=5$ ) vs.  $12,5 \pm 3,56$  Tage unter 10 mg/kg/die MNA 715 bzw.  $23,5 \pm 4,68$  Tage unter 1 mg/kg/die FK 506 als

Monotherapie. Bei Applikation von 20 mg/kg/die MNA 715 und 1 mg/kg/die FK 506 verstarben alle therapierten Tiere innerhalb von 7 Tagen nach Transplantation und Therapiebeginn, allerdings mit schlagenden Herzen. Die entsprechende Kurve in Abbildung 5 (20 mg/kg/die MNA 715 und 1 mg/kg/die FK 506) zeigt also die Überlebenskurve der Mäuse, nicht aber die der Transplantate. Es waren ähnliche Symptome zu beobachten wie unter Monotherapie mit 30 mg/kg/die MNA 715 (reduzierter Allgemeinzustand, Anämie). Somit konnte im Modell der heterotopen HTx in der Maus kein Synergismus zwischen MNA 715 und FK 506 nachgewiesen werden. Zum Teil schienen sich die Nebenwirkungen sogar zu addieren, ohne daß ein ähnlicher Effekt für die Wirkungen zu beobachten war.

## 3.1.5. Zusammenfassung der Transplantat-Überlebenskinetik

Tabelle 2 soll einen Überblick über das Transplantatüberleben in den einzelnen Gruppen geben.

**Tab. 2:** Übersicht über das Transplantatüberleben in den einzelnen Gruppen

Gruppen:	Therapie:	Abstoßung (Tage):	Mittlere Überlebenszeit (± SA):	p
Syngene Kontrolle	Keine	>100, >100, >100, >100, >100, >100,	>100 ± 0	
Allogene Kontrolle (1)	Keine	8, 7, 7, 7, 7, 9	7,5 ± 0,84	
CMC Kontrolle	0,1 ml 1% CMC*	7, 8, 9	8 ± 1	
Allogen 5 mg/kg/die MNA 715	5 mg/kg/die MNA 715*	7, 7, 8, 8, 7, 6	7,2 ± 0,75	
Allogen 10 mg/kg/die MNA 715 (2)	10 mg/kg/die MNA 715*	14, 10, 10, 19, 10, 12	12,5 ± 3,56	0,007 (vs. 1)
Allogen 20 mg/kg/die MNA 715	20 mg/kg/die MNA 715**	12, 14, 14, 15, 18	14,6 ± 2,19	
Allogen 20 mg/kg/die MNA 715	20 mg/kg/die MNA 715*	54, 31, 85, 34, 43, 43, 43, >100, >100, >100	>63,3 ± 29,32	0,004 (vs. 1)
Allogen 30 mg/kg/die MNA 715	30 mg/kg/die MNA 715*	(8), (4), (7) ***	(6,3) ± 2,08	
Allogen 0,5 mg/kg/die FK 506	0,5 mg/kg/die FK 506 *	7, 9, 10., 10, 10, 13	9,8 ± 1,67	
Allogen 1 mg/kg/die FK 506 (3)	1 mg/kg/die FK 506 *	13, 32, 24, 28, 22, 22	23,5 ± 6,44	0,0001 (vs.1)
Allogen 3 mg/kg/die FK 506	3 mg/kg/die FK 506**	24, 25, 27, 31, 34, 35	29,3 ± 4,68	
Allogen 3 mg/kg/die FK 506	3 mg/kg/die FK 506*	39, 42, 33, 42, 41, 41	39,7 ± 3,44	0,8 x 10 <sup>-9</sup> (vs. 1)
Allogen MNA 715 und FK 506	10 mg/kg/die MNA 715 und 1 mg/kg/die FK 506 *	11, 15, 12, 29, 30	19,4 ± 9,34	0,13 (vs. 2) 0,4 (vs. 3)
Allogen MNA 715 und FK 506	20 mg/kg/die MNA 715 und 1 mg/kg/die FK 506 ***	(5), (5), (7), (7) ***	(6)	

\* Therapiedauer von Tag 0 bis Abstoßung/Tag 20 nach Transplantation

\*\* Therapiedauer von Tag 0 bis Tag 6 nach Transplantation

\*\*\* Tod der Mäuse infolge therapiebedingter Nebenwirkungen

### 3.2. Beeinflussung der Abstoßung ex vivo

#### 3.2.1. Konventionelle Histologie

Um das histologische Korrelat einer Immunsuppression mit FK 506 bzw. MNA 715 zu erfassen, wurden am 5., 15., 30 und 100. Tag nach erfolgter Transplantation aus den relevanten Gruppen (siehe Tabelle 3) Tiere geopfert und die Transplantate wie unter 2.2.1.1. angegeben gefärbt und ausgewertet.

Allen Organen gemeinsam waren dabei Veränderungen, die zum einen aus der Art der Gefäßanastomosen resultierten, welche zu einer Ausschaltung des linken Ventrikels aus dem Blutkreislauf führten (vgl. 2.1.4.2.2.). Zum anderen wurden sie als Korrelat eines Ischämie-Reperfusionsschadens gedeutet. Diese Veränderungen sollen hier kurz dargestellt werden. Sie waren grundsätzlich bei allen Herzen unabhängig von der Stammkombination (syngen/allogen) oder von der Therapie (keine, FK 506, MNA 715) zu beobachten, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung. Am Tag 5 zeigte sich im Lumen des linken Ventrikels ein Thrombus, der bereits diskrete Zeichen einer Organisation aufwies. Nach 15 Tagen war dieser Thrombus zellreich verändert und im wesentlichen organisiert, d.h. fibrös umgebaut. Zudem trat ab diesem Zeitpunkt eine, v.a. in der Elastica-van-Gieson sichtbare, lumennahe Fibrose auf, die in syngen transplantierten Herzen, bis zum Tag 100 nach Transplantation, nur diskret progredient erschien (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Veränderung wurde als Innenschichtschaden gedeutet, der durch die verminderte Perfusion der lumennahen Myokardabschnitte aufgrund des Perfusionsausfalls der direkt aus dem linken Ventrikel entspringenden Gefäße bedingt war. Eine begleitende Perikarditis war ebenfalls eine allen Herzen gemeinsame Veränderung.

In Anlehnung an die unter 2.2.1.3. dargestellte Billingham-Klassifikation wurden die mit HE gefärbten Herzen wie in Tabelle 3 aufgelistet eingeteilt. An dieser Stelle muß nochmals darauf hingewiesen werden, daß in unserem Modell eine Abstoßung Billingham Grad 2 nicht existiert. Daher wurden im vorliegenden Fall die Organe vereinfacht von Grad 0 bis Grad 3 eingeteilt.

Am Tag 5 nach HTx zeigten untherapiert allogen transplantierte Herzen deutliche Zeichen einer Abstoßung. Alle untersuchten Organe wiesen ein dichtes Infiltrat lymphoider Zellen mit

deutlichen Zeichen einer Myozytolyse auf. Sie wurden mit Grad 3 (entspricht Billingham Grad 3B bis 4) klassifiziert.

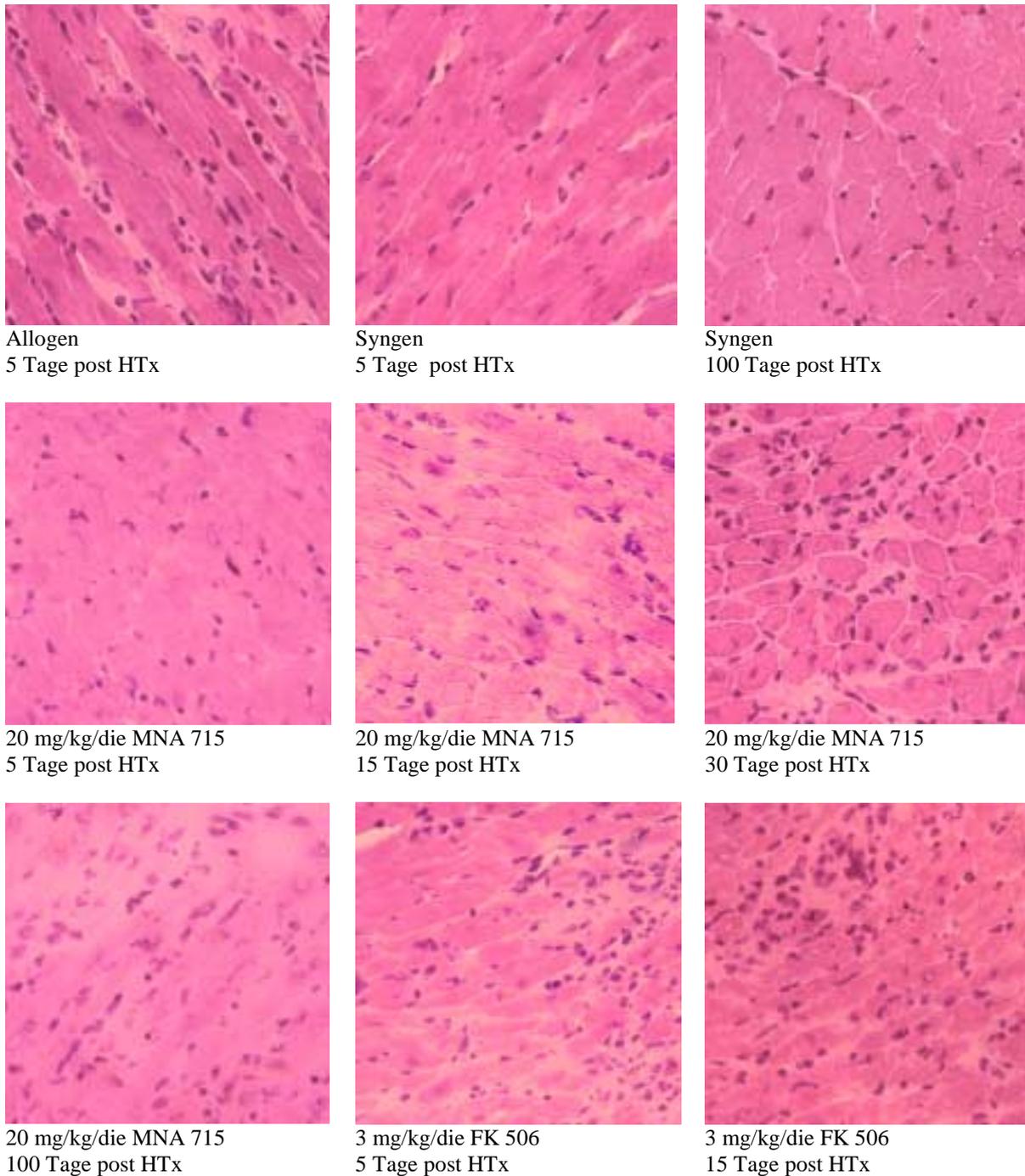
**Tab. 3:** *Klassifikation der Transplantate in Anlehnung an Billingham*

Tag nach Herztransplantation	Allogene Kontrolle	Syngene Kontrolle	FK 506 3 mg/kg/die	MNA 715 20 mg/kg/die
5	3, 3	0, 0	3, 3, 3, 3	1, 1, 1, 1
7	Nach Abstoßung 3, 3	n.d.	n.d.	n.d.
15	n. m.	0, 0	1, 2, 3, 1	2, 1, 2, 1
30	n. m.	n.d.	n. m.	3, 3, 3, 2
100	n. m.	0, 0	n. m.	3, 3, 3

*n.m.* Eine Untersuchung der Transplantate zu diesem Zeitpunkt war nicht möglich, da in der entsprechenden Gruppe ein entsprechendes Transplantatüberleben nicht sicher erreicht werden konnte.

*n.d.* Eine Untersuchung der Organe zu diesem Zeitpunkt wurde nicht durchgeführt, da mit keiner Veränderung des Histologiebefundes im Vergleich zu Tag 15 nach Transplantation zu rechnen war.

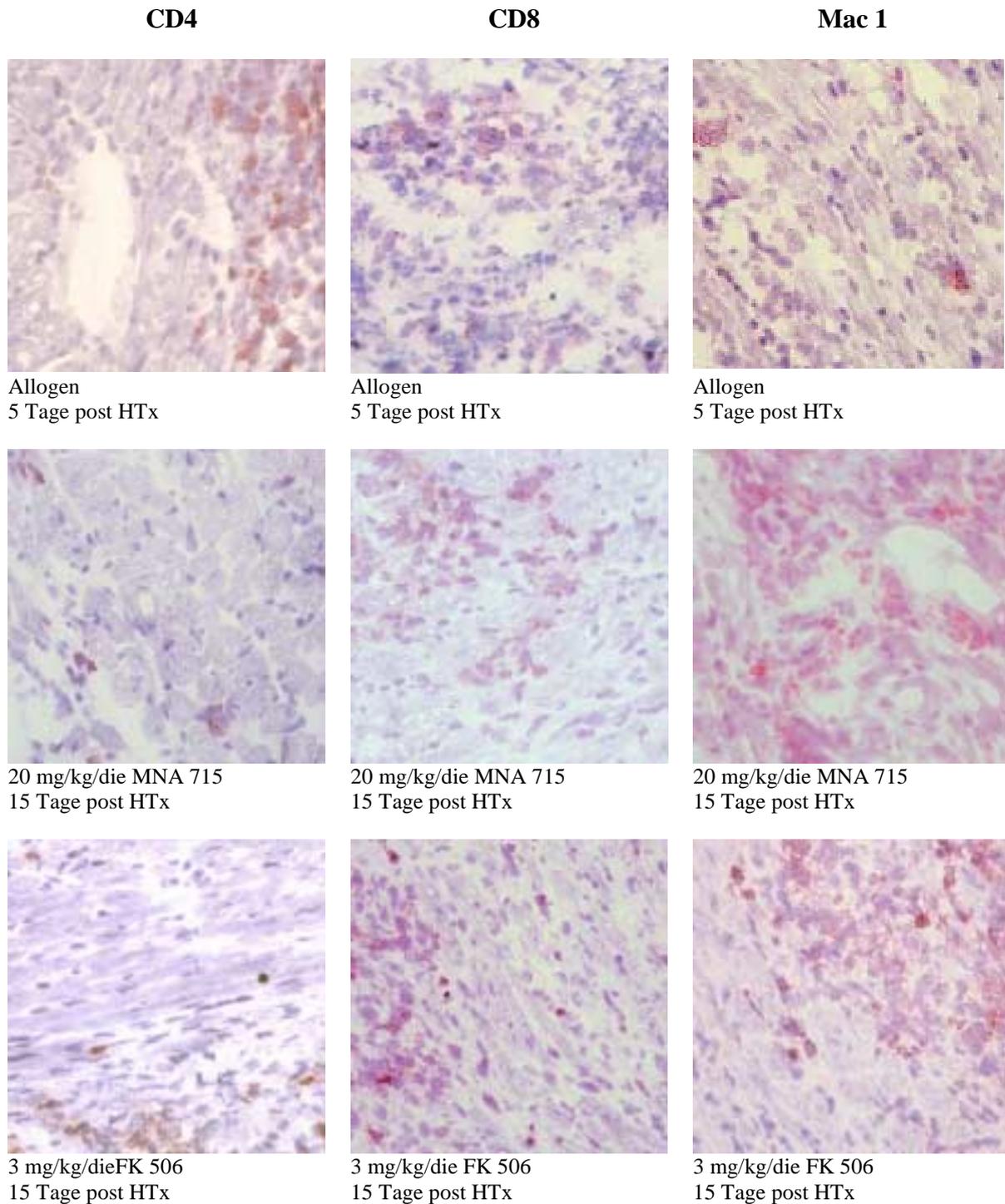
Die syngen transplantierten Herzen wurden zum gleichen Zeitpunkt mit Grad 0 bewertet. Auch im gesamten Verlauf bis Tag 100 nach Transplantation zeigten diese Herzen keine Abstoßungszeichen (Tag 15: Grad 0, Grad 0; Tag 100: Grad 0, Grad 0). 5 Tage nach HTx wurden alle MNA 715 (20 mg/kg/die) therapierten Organe mit Grad 1 (Billingham Grad 1A und 1B) bewertet. 15 Tage nach Transplantation zeigten 50% der Herzen Veränderungen vom Grad 1 und 50% Veränderungen vom Grad 2 (entspricht Billingham 3A). Am Tag 5 nach Transplantation zeigten die mit 3 mg/kg/die FK 506 therapierten Herzen die gleichen Veränderungen wie untherapiert allogene transplantierte Organe (4 x Grad 3). 15 Tage nach HTx zeigen FK 506 (3 mg/kg/die) therapierte Organe Veränderungen, die von Grad 1 bis Grad 3 (aggressive Infiltration mit Zeichen einer Myozytolyse = Billingham Grad 3B und 4) eingestuft wurden. Durch Immunsuppression mit FK 506 konnte kein Organüberleben von 30 Tagen gesichert werden. Daher standen 30 und 100 Tage nach Transplantation nur syngene und mit MNA 715 therapierte, allogene Herzen zur Verfügung. Hier zeigten sich bei den Organen unter MNA 715 Therapie (20 mg/kg/die, Tag 0 bis 20) Veränderungen im Sinne einer Abstoßung, welche nach 30 Tagen als Grad 3 (3x), bei einem Herz sogar lediglich als Grad 2 imponierten. Nach 100 Tagen standen nur drei mit MNA 715 therapierte Herzen zur Verfügung, welche alle Grad 3 einer Abstoßung aufwiesen. Bei den syngen transplantierten Herzen konnten auch nach 100 Tagen keine Zeichen einer Abstoßung nachgewiesen werden (Vgl. Abbildung 6).



**Abb. 6:** Übersicht über die konventionell mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Herzen

Die Abbildung zeigt exemplarisch nach HE gefärbte Herzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Herztransplantation. Alle mit MNA 715 bzw. FK 506 therapierten Herzen wurden vollallogen (HTx BALB/c → C57BL/6) transplantiert. Dabei wurden bis zum Zeitpunkt der Explantation, maximal jedoch bis zum Tag 20 post HTx, 20 mg/kg/die MNA 715 bzw. 3 mg/kg/die FK 506 appliziert.

## 3.2.3. Immunhistologie



**Abb. 7:** Ergebnisse der Immunhistologie

In der ersten Spalte ist eine CD4-Färbung dargestellt. Hierdurch kommen CD4+ T-Lymphozyten zur Darstellung. In der zweiten Spalte ist eine CD8-Färbung (färbt CD8+ T-Lymphozyten) dargestellt. Die dritte Spalte zeigt eine Mac1-Färbung. Dieser Oberflächenmarker ist spezifisch für Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen. In den

*Zeilen sind von oben nach unten folgende Gruppen aufgeführt: Vollallogen (HTx BALB/c → C57BL/6) ohne Immunsuppression, Explantation 5 Tage post HTx; vollallogen, Immunsuppression mit 20 mg/kg/die MNA 715 von Tag 0 bis zum Zeitpunkt der Explantation (15 Tage post HTx) und vollallogen, Immunsuppression mit 3 mg/kg/die FK 506 von Tag 0 bis zum Zeitpunkt der Explantation (15 Tage post HTx).*

In der immunhistologischen Untersuchung der Organe waren in syngenen Herzen zu keinem Zeitpunkt T-Lymphozyten (CD4+ bzw. CD8+), Makrophagen, Granulozyten oder NK-Zellen nachweisbar (Mac-1+ bzw. Gr-1+).

In den Organen ohne Immunsuppression fand sich bereits am 5. Tag nach Transplantation ein deutliches Infiltrat. Für alle verwendeten Antikörper konnten reichlich positive Zellen nachgewiesen werden (CD4, CD8, Mac-1). Die Gegenfärbung mit Gr1 zeigte, daß sich unter den Mac1+ Zellen nur zu einem geringen Anteil Granulozyten befanden (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Resultaten konnte der Schluß gezogen werden, daß das Infiltrat, welches für die Abstoßung der Herzen verantwortlich war, hauptsächlich aus T-Lymphozyten, Makrophagen und/oder NK-Zellen sowie vereinzelt aus Granulozyten besteht. Die zeitliche Beeinflussung der Infiltration durch FK 506 bzw. MNA 715 wurde bereits unter 3.2.1. dargestellt. In der Immunhistologie zeigte sich, daß weder FK 506 noch MNA 715 das Infiltrat in seiner Zusammensetzung beeinflussen. Abbildung 7 zeigt die Zusammensetzung der Infiltrate.

### 3.1.3. RNase Protection Assay

Die RNS-Isolierung für das RPA erfolgte wie unter 2.2.2.1. beschrieben. Bezüglich des zugrundeliegenden Prinzips soll an dieser Stelle noch einmal auf Punkt 2.2.2.2. verwiesen werden. Das RPA wurde unter Verwendung der Template-Sets 2b (Cat. #45051P) und 5 (Cat. #45026P) des Herstellers (PharMingen; 10975 Torreyana Road; San Diego, CA 92121, USA) durchgeführt. Template-Set 5 wurde leicht modifiziert, so daß auch TNF $\alpha$  enthalten war. Hierdurch wurden die in Tabelle 4a und 4b zusammengefaßten Zyto- bzw. Chemokine erfaßt. Zudem sind in den Tabellen diejenigen Zyto- bzw. Chemokine markiert, die in den untersuchten Herzen nicht nachgewiesen werden konnten.

**Tab. 4b:** Übersicht über die durch das Template-Set 2b erfaßten Zyto- bzw. Chemokine

<b>Template-Set 2b:</b>	<i>IL-12p35</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<i>IL-12p40</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<b>IL-10</b>	<b>Nachgewiesen</b>
	<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Nachgewiesen</b>
	<i>IL-1Ra</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<i>IL-18</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<i>IL-6</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Nachgewiesen</b>
	<i>MIF</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<i>L32</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<b>GAPDH</b>	<b>Nachgewiesen</b>

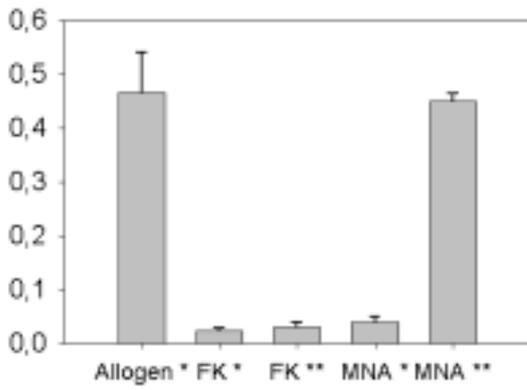
**Tab. 4b:** Übersicht über die durch das Template-Set 5 erfaßten Zyto- bzw. Chemokine

<b>Template-Set 5:</b>	<b>Ltn</b>	<b>Nachgewiesen</b>
	<b>RANTES</b>	<b>Nachgewiesen</b>
	<i>Eotaxin</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	<b>Nachgewiesen</b>
	<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	<b>Nachgewiesen</b>
	<b>MIP-2</b>	<b>Nachgewiesen</b>
	<b>IP-10</b>	<b>Nachgewiesen</b>
	<i>MCP-1</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<i>TCA-3</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<i>L32</i>	<i>Nicht nachgewiesen</i>
	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>Nachgewiesen</b>
	<b>GAPDH</b>	<b>Nachgewiesen</b>

Zur Auswertung wurden die Bandenintensitäten der entsprechenden RNS-Sequenzen in Relation zur Bande der RNS für GAPDH gesetzt und als Prozentsatz der GAPDH-RNS angegeben. Diesem Ansatz liegt die Überlegung zugrunde, daß GAPDH als sog. „housekeeping-gene“ angesehen wird, welches in bzw. auf allen Zellen in etwa der gleichen Menge vorhanden ist. Somit ist garantiert, daß die Ergebnisse unabhängig von der zur Verfügung stehenden Gesamt-RNS ausgewertet werden können.

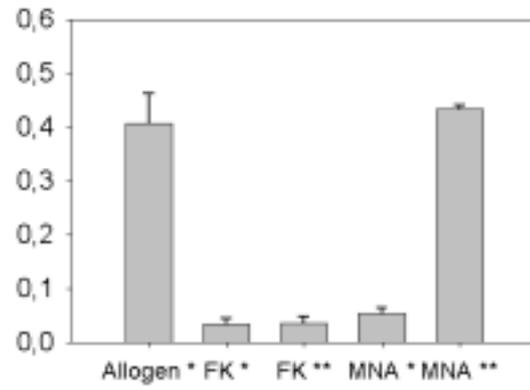
Die Abbildungen 8a-j zeigen die graphische Auswertung der Ergebnisse des RPA.

**Mip-1-alfa**



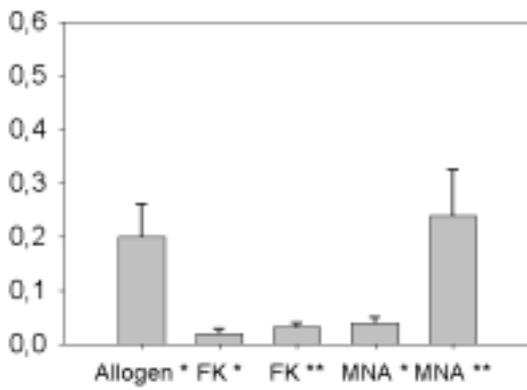
**Abb. 8a**

**Mip-1-beta**



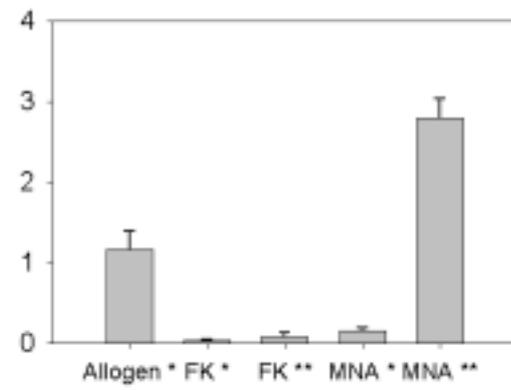
**Abb. 8b**

**Mip-2**



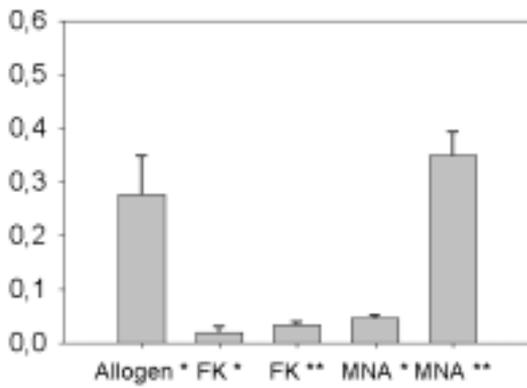
**Abb. 8c**

**RANTES**



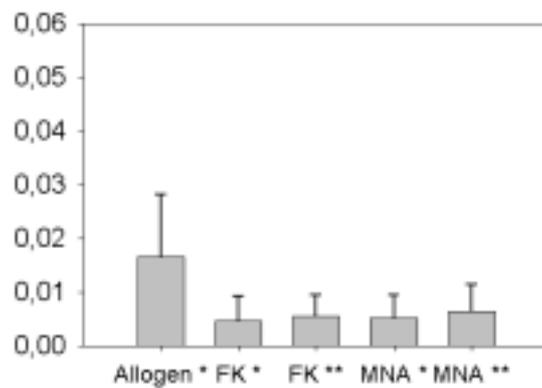
**Abb. 8d**

**TNF**



**Abb. 8e**

**IL 10**



**Abb. 8f**

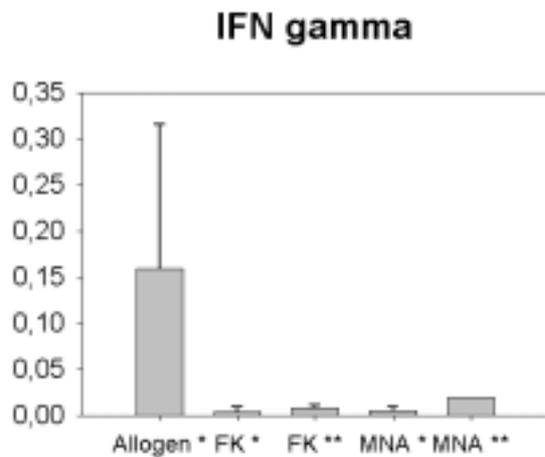


Abb. 8g

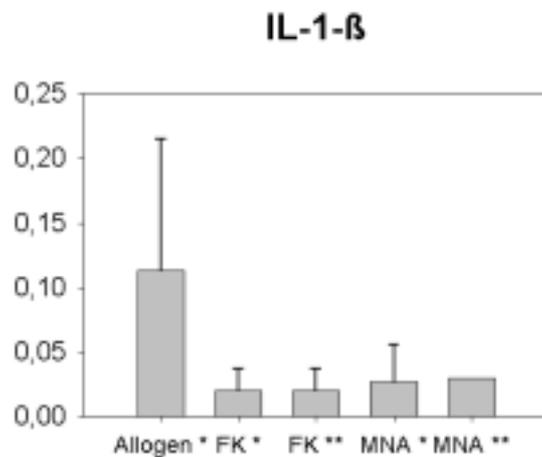


Abb. 8h

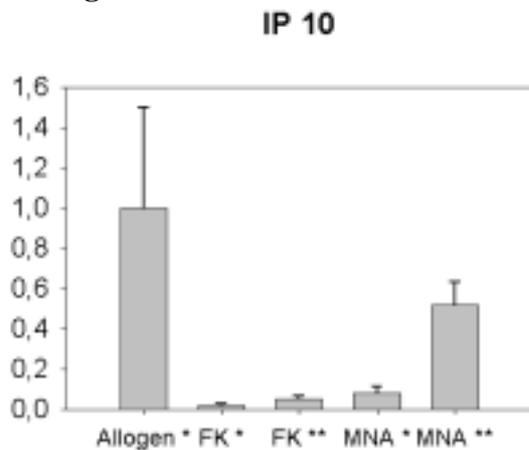


Abb. 8i

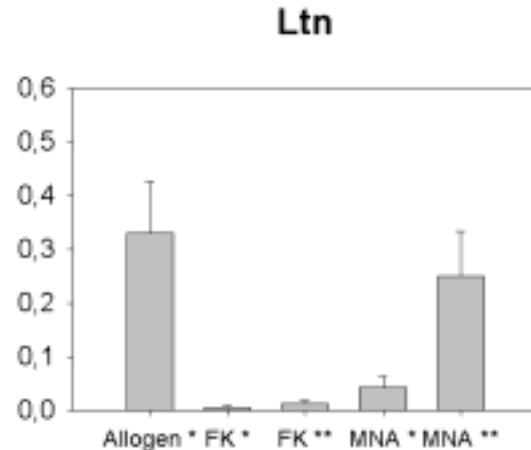


Abb. 8j

#### Abb. 8a-j: Ergebnisse des RNase Protection Assay

Die Ergebnisse des RNase Protection Assay sind wie folgt dargestellt: Alle Herztransplantationen erfolgten vollalloge (HTx BALB/c → C57BL/6). Die jeweils erste Säule zeigt die voll-allogene Kontrollgruppe (keine Therapie, Explantation 5 Tage post HTx). Die zweite und dritte Säule repräsentieren Herzen, die von Tag 0 bis zum Explantationszeitpunkt mit 3 mg/kg/die mit FK 506 therapiert wurden (\* Explantation 5 Tage post HTx; \*\* Explantation 15 Tage post HTx). Analog dazu stehen die Säulen 4 und 5 für mit MNA 715 (20 mg/kg/die) therapierte Herzen. Auch hier wurde von Tag 0 bis zur Explantation therapiert (\* Explantation 5 Tage post HTx; \*\* Explantation 15 Tage post HTx).

Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse des RNase Protection Assays. Alle Ergebnisse sind als Quotient aus der Intensität an mRNA des jeweiligen Zyto- bzw. Chemokins und der mRNA Intensität von GAPDH (mRNA(x)/mRNA(GAPDH)) angegeben (siehe auch Gliederungspunkt 2.2.2.2.).

Sowohl in der graphischen wie auch in der tabellarischen Darstellung ist zu erkennen, daß nach allogener Transplantation ohne Immunsuppression bereits nach 5 Tagen ein deutlicher Anstieg auf Ebene der mRNA für alle nachweisbaren Zyto- bzw. Chemokine zu verzeichnen

**Tab. 5: Übersicht über die Ergebnisse des RPA**

mRNS(x)	Allogen 5d* (1) n=3	FK 506 5d * (2) n=3	FK 506 15d * (3) n=3	MNA 715 5d * (4) n=3	MNA 715 15 d* (5) n=2	P (4) vs. (1)	p (5) vs. (1)
<b>Mip-2</b>	0,27; 0,16; 0,17 <b>M=0,2</b>	0,02; 0,03; 0,01 <b>M=0,02</b>	0,03; 0,03; 0,04 <b>M=0,033</b>	0,05; 0,04; 0,03 <b>M=0,04</b>	0,3; 0,18 <b>M=0,24</b>	<b>0,01</b>	0,57 n.s.
<b>Mip-1-α</b>	0,54; 0,39; 0,47 <b>M=0,47</b>	0,02; 0,03; 0,02 <b>M=0,023</b>	0,04; 0,03; 0,02 <b>M=0,03</b>	0,05; 0,04; 0,03 <b>M=0,04</b>	0,46; 0,44 <b>M=0,45</b>	<b>0,0006</b>	0,79 n.s.
<b>Mip-1-β</b>	0,47; 0,36; 0,39 <b>M=0,41</b>	0,04; 0,04; 0,02 <b>M=0,033</b>	0,05; 0,03; 0,03 <b>M=0,037</b>	0,06; 0,06; 0,04 <b>M=0,053</b>	0,44; 0,43 <b>M=0,44</b>	<b>0,0004</b>	0,55 n.s.
IL-10	0,01; 0,03; 0,01 <b>M=0,017</b>	0,01; 0,00254, 0,0015 <b>M=0,0047</b>	0,00236; 0,00447; 0,01 <b>M=0,0057</b>	0,00188; 0,01; 0,00377 <b>M=0,0052</b>	0,01; 0,00295 <b>M=0,0065</b>	0,18 n.s.	0,34 n.s.
IFN-γ	0,08; 0,34; 0,06 <b>M=0,16</b>	0,01; 0,00408; 0,00296 <b>M=0,0048</b>	0,01; 0,00382; 0,01 <b>M=0,0079</b>	0,00244; 0,01; 0,0024 <b>M=0,0049</b>	0,02; 0,02 <b>M=0,02</b>	0,16 n.s.	0,3 n.s.
TNF	0,36; 0,23; 0,24 <b>M=0,28</b>	0,02; 0,03; 0,01 <b>M=0,02</b>	0,03; 0,04; 0,03 <b>M=0,033</b>	0,05; 0,05; 0,04 <b>M=0,047</b>	0,38; 0,32 <b>M=0,35</b>	<b>0,005</b>	0,3 n.s.
IL-1-β	0,07; 0,23; 0,04 <b>M=0,11</b>	0,04; 0,01; 0,01 <b>M=0,02</b>	0,01; 0,01; 0,04 <b>M=0,02</b>	0,01; 0,06; 0,01 <b>M=0,027</b>	0,03; 0,03 <b>M=0,03</b>	0,23 n.s.	0,35 n.s.
IP 10	1,57; 0,66; 0,77 <b>M=1</b>	0,02; 0,03; 0,01 <b>M=0,02</b>	0,07; 0,04; 0,05 <b>M=0,053</b>	0,11; 0,09; 0,04 <b>M=0,08</b>	0,6; 0,44 <b>M=0,52</b>	0,032 n.s.	0,29 n.s.
<b>RANTES</b>	1,36; 0,91; 1,22 <b>M=1,16</b>	0,03; 0,05; 0,03 <b>M=0,037</b>	0,08; 0,06; 0,13 <b>M=0,135</b>	0,19; 0,17; 0,12 <b>M=0,16</b>	2,97; 2,64 <b>M=2,81</b>	<b>0,0017</b>	n.s.
Ltn	0,37; 0,22; 0,4 <b>M=0,33</b>	0,00449; 0,01; 0,00115 <b>M=0,0052</b>	0,01; 0,02; 0,01 <b>M=0,013</b>	0,06; 0,05; 0,02 <b>M=0,043</b>	0,31; 0,19 <b>M=0,25</b>	<b>0,007</b>	0,04

\* alle Angaben als  $mRNS(x)/mRNS(GAPDH)$ ; M = Mittelwert

war. In syngen transplantierten Herzen war am 5. und 15. Tag nach Transplantation keines, der durch die genannten Template-Sets erfaßten Zyto- bzw. Chemokine auf mRNS-Ebene nachweisbar. Unter Immunsuppression mit FK 506 (3 mg/kg/die) und MNA 715 (20 mg/kg/die) waren 5 Tage post HTx zwar alle ausgewerteten Zyto- und Chemokine nachweisbar, aber auf deutlich niedrigerem mRNS-Niveau. Statistisch signifikant waren diese verminderten mRNS-Level allerdings nur für Mip-2, Mip-1-α, Mip-1-β, TNF, RANTES und Ltn (t-Test,  $p < 0,01$ ). Am Tag 15 post HTx kam es in den mit MNA 715 therapierten Herzen zu einer Hochregulation von Mip-1-α, Mip-1-β, Mip-2, RANTES, TNF, IP 10 und Ltn.. Hierbei wurden mRNS-Spiegel nachgewiesen, die denen der allogen transplantierten und nicht immunsuppressiv behandelten Herzen am Tag 5 nach HTx in etwa entsprachen. Unter Therapie mit FK 506 konnten 15 Tage nach HTx nur deutlich geringere und im Vergleich zu den Werten am Tag 5 nach HTx und Immunsuppression mit FK 506 nicht signifikant erhöhte mRNS-Spiegel gemessen werden.

#### 4. Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es, einen Vertreter der Wirkstoffklasse der Malononitrilamide, das MNA 715, auf seine immunsuppressive Potenz im Modell der heterotopen HTx in der Maus zu untersuchen. Zudem sollte ein möglicher Synergismus mit dem bereits etablierten Immunsuppressivum FK 506 evaluiert werden. Hierzu wurden zunächst für beide Immunsuppressiva getrennt und anschließend bei simultaner Applikation Dosis-Wirkungs-Beziehungen erstellt. Zusätzlich zu den in vivo Versuchen wurden für beide Wirkstoffe in vitro Daten (konventionelle Histologie und Immunhistologie, RPA) erhoben, um eine Vorstellung über den Wirkmechanismus von MNA 715 zu erhalten. Daraus sollten Erkenntnisse über einen zukünftig möglichen Einsatz der Malononitrilamide in der Prophylaxe und in der Therapie von Transplantatabstoßung beim Menschen gewonnen werden.

Bezüglich der Transplantatüberlebenskinetik zeigte sich MNA 715 als potentes Immunsuppressivum. In Abhängigkeit von der applizierten Dosis konnte, im Gegensatz zu FK 506, bei Gabe von 20 mg/kg/die über lediglich 21 Tage sogar zu 30% Langzeitüberleben von über 100 Tagen erreicht werden. Das mediale Transplantatüberleben betrug unter Therapie mit 20 mg/kg/die MNA 715 (Tag 0 bis 20)  $63,3 \pm 14,8$  Tage, unter Therapie mit 3 mg/kg/die FK 506 (Tag 0 bis 20)  $39,7 \pm 3,44$  Tage. Die Ergebnisse für beide Immunsuppressiva unterscheiden sich zwar biologisch, erweisen sich aber als statistisch nicht signifikant unterschiedlich zueinander ( $p(20 \text{ mg MNA 715 vs. } 3 \text{ mg FK 506}) = 0,073$ ). Auch andere Arbeitsgruppen konnten unter Verwendung von Malononitrilamiden in der Immunsuppression nach Transplantation, ähnliche Ergebnisse erzielen (85, 122). Zum Teil konnte durch Applikation von MNAs in Kombination mit CsA eine permanente Akzeptanz des Transplantats erzielt werden (85). Diese Ergebnisse wurden jedoch im Rattenmodell erarbeitet. Das Mausmodell hat sich im Vergleich dazu in der Vergangenheit als wesentlich stärker allogren erwiesen. Unter gleichen Bedingungen stellt sich in der Maus (ähnlich wie beim Menschen) ein abstoßungsbedingter Transplantatverlust wesentlich häufiger ein als in der Ratte. Auch Immunsuppressiva, die für die Anwendung bei der Immunsuppression nach Transplantation im Menschen bereits etabliert sind, können mitunter in der Maus versagen bzw. zu keinem signifikant verlängerten Transplantatüberleben führen. Für CsA liegen unserer Arbeitsgruppe derartige Ergebnisse vor. So konnte durch Applikation von 15 mg/kg/die CsA Tag 0 bis 6 lediglich ein Überleben der heterotop transplantierten Herzen von  $9,9 \pm 1,1$  Tagen (vs.  $7,5 \pm 0,84$  Tage in den allogenen Kontrollgruppe) erreicht werden (Stefan Meier, Daten nicht gezeigt). Eine zeitlich limi-

tierte Applikation von MNA 715 führte jedoch zu 30% Langzeitüberleben von >100 Tagen. Dies läßt MNA 715 als hochpotentes Immunsuppressivum erscheinen.

Der ursprünglich vermutete und für das Rattenmodell bereits publizierte Synergismus zwischen MNA 715 bzw. Leflunomid und CsA bzw. FK 506 (85, 122, 123, 128, 131, 132) konnte in der vorliegenden Dissertation nicht nachgewiesen werden. Die gemeinsame Applikation von 10 mg/kg/die MNA 715 und 1 mg/kg/die FK 506 erbrachte, im Vergleich zur Gabe der jeweiligen Einzelsubstanz in der gleichen Dosierung, kein verlängertes Organüberleben ( $19,4 \pm 9,34$  Tage vs.  $12,5 \pm 3,56$  Tage (10 mg/kg/die MNA 715) vs.  $23,5 \pm 6,44$  Tage (1 mg/kg/die FK 506)). Eine Steigerung der Dosis von MNA 715 auf 20 mg/kg/die führte bei gleichzeitiger Gabe von 1 mg/kg/die FK 506 zum Tod der Tiere zwischen dem 5. und 7. Tag nach allogener HTx. Über den Grund für diese fehlenden additiven bzw. synergistischen Effekte in der Maus liegen derzeit noch keine Daten vor. Neben Leflunomid konnte auch für Brequinar Natrium bzw. seinem Analogon S-8660 (ebenfalls ein Inhibitor der DHODH) ein derartiger Synergismus mit FK 506 und CsA nachgewiesen werden (33-35, 101). Die meisten dieser Ergebnisse wurden allerdings in der Ratte erzielt. Unter Umständen spielt hier die größere Allogenetität des Mausmodells eine Rolle. Nachdem MNA 715 oral, FK 506 aber s.c. verabreicht wurde, scheint eine gegenseitige Resorptionshemmung auszuschneiden. Auch die intrazellulären Wirkungsweisen beider Substanzen unterscheiden sich. FK 506 bindet an das FKBP und hemmt die T-Zell-Aktivierung über eine Hemmung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Freisetzung (48). MNA 715 wirkt zum einen über eine Hemmung der DHODH, zum anderen hemmt es über diverse Tyrosin-Kinasen (siehe 1.2.3.) die Signaltransduktion (156). Für den Leflunomid Hauptmetaboliten A77 1762 konnte gezeigt werden, daß es an die DHODH bindet (43, 58, 154). Für MNA 715 wird dies ebenfalls angenommen. Man würde also eine synergistische Wirkung erwarten, die in unseren Versuchen aber nicht nachzuweisen war. Lediglich die Toxizität von MNA 715 scheint bei Koapplikation von FK 506 erhöht zu sein.

Auch bei alleiniger Gabe von 30 mg/kg/die MNA 715 starben die Tiere zwischen dem 4. und 8. Tag post OP. Im Verlauf wurden diese Tiere zunehmend kachektisch. Ihre Reaktion war deutlich verlangsamt und ihr Aussehen wurde progredient anämisch. Post mortem konnten in der Sektion multiple Ulzera im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Bei einer optimal wirksamen Dosis von 20 mg/kg/die MNA 715 und einer zumindest in der Maus letalen Dosis von 30 mg/kg/die erwies sich die therapeutische Breite von MNA 715 als nur sehr gering. Für Brequinar Natrium sind unter anderem dieselben Nebenwirkungen beschrieben (90). Ein toxi-

scher Effekt von Malononitrilamiden auf Knochenmarksstammzellen konnte mittlerweile nachgewiesen werden (37). Man geht davon aus, daß hoch proliferative Zellen, v.a. Lymphozyten, sowohl die de novo Pyrimidin Synthese, als auch den Recycling Pathway benötigen, um ihren Pyrimidinbedarf zu decken. Dem gegenüber scheinen Zellen mit geringere Proliferationsrate allein durch Recycling genügend Pyrimidine zu rekrutieren (36, 72). Hieraus ist ersichtlich, daß Inhibitoren der DHO-DH, ähnlich wie Zytostatika, v.a. Zellen mit hoher Proliferationsrate angreifen. Die Tatsache, daß sich sowohl Leflunomid als auch Brequinar Natrium bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie des Lupus Erythematoses oder der rheumatoiden Arthritis, als hochwirksam erwiesen (36, 72, 120), ist ein Indiz für eine eher globale Immunsuppression. Für Brequinar Natrium ist zudem eine Anti-Tumor Aktivität nachgewiesen (116). Angesichts dieser in vitro Daten lassen sich die gefundenen Nebenwirkungen gut nachvollziehen und für MNA 715 ein ähnlicher Wirkmechanismus wie für Leflunomid postulieren.

Auch die Histologie konnte die in vivo gewonnenen Daten untermauern. Nach 5 Tagen unter Therapie mit 20 mg/kg/die MNA 715 wurde lediglich eine Infiltration Grad 1 A/B nach Billingham nachgewiesen. In Gegensatz dazu zeigte sich nach 5 Tagen unter Therapie mit 3 mg/kg/die FK 506 in allen Herzen eine Infiltration Grad 4 nach Billingham. 15 Tage nach allogener HTx wurde in den mit MNA 715 therapierten Herzen zu je 50% eine Infiltration Grad 1 A/B und 3 A/B nach Billingham gefunden. Unter FK 506 zeigte sich zu diesem Zeitpunkt in 50% der Organe Grad 1 A/B, in je 25% Grad 3 A/B und Grad 4 nach Billingham. Nach Absetzen der Immunsuppression 21 Tage post OP, konnte durch FK 506 kein sicheres Transplantatüberleben bis zum Tag 30 nach Transplantation gesichert werden. Nach Absetzen von MNA 715 zeigten die Organe 30 Tage nach HTx zu 75% eine Infiltration Grad 4 nach Billingham, zu 25% lediglich Grad 3 A/B. In 30% der Mäuse konnte sogar ein Transplantatüberleben von 100 Tagen erreicht werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Erkenntnissen aus dem Rattenmodell. In der Ratte konnte zum Teil durch alleinige, zeitlich limitierte Gabe von Leflunomid oder von Malononitrilamiden indefinitives Transplantatüberleben von über 100 Tagen erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, daß durch eine zeitlich begrenzte Applikation von MNA 279 und CsA in der Ratte spenderspezifische Toleranz induziert werden kann (85). Im Rahmen dieser Dissertation wurden alle Organe, bei denen sich nach 100 Tagen noch Kontraktivität zeigte, einer histologischen Untersuchung unterzogen. Alle wiesen eine deutliche Abstoßung Grad 4 nach Billingham auf. Hinzu kamen Veränderungen im Sinne einer chronischen Abstoßung. Bereits unter Therapie mit 20 mg/kg/die MNA

715 waren deutliche Zeichen einer Abstoßung zu beobachten. Im Vergleich zu FK 506 traten diese zwar zeitlich leicht verzögert auf, nach 15 Tagen zeigten sich aber kaum noch Unterschiede. Nach Absetzen der Immunsuppression verliefen diese Vorgänge progredient. Im vorliegenden Fall kann demnach nicht von Toleranz gesprochen werden.

In der Immunhistologie zeigte sich, daß weder FK 506 noch MNA 715 das Infiltrat in seiner Zusammensetzung verändern. Lediglich Zeitpunkt und Progreß der Infiltration werden wie unter 3.1. dargestellt beeinflußt.

Es muß betont werden, daß sowohl unter FK 506 als auch unter MNA 715 in allen Schnitten wenigstens eine Abstoßung Billingham Grad 1 beobachtet wurde, was auf eine insgesamt unzureichende Immunsuppression hinweist. Eine weitere Dosissteigerung war bei MNA 715 (30 mg/kg/die) mit 100% Mortalität vergesellschaftet. Für FK 506 wurde die in der Maus maximal wirksame Dosis nicht ermittelt, da nur die subtherapeutische Dosis von Interesse war, um einen möglichen Synergismus mit MNA 715 nachzuweisen. Im Menschen wird FK 506 in der Immunsuppression nach Organtransplantation in einer Dosis von ca. 0,15 mg/kg/die i.v. und 0,3 mg/kg/die p.o. eingesetzt, woraus ersichtlich ist, daß die in der vorliegenden Dissertation angewandten Dosen als eher hoch einzuschätzen sind (66, 73, 74). Diese für FK 506 vorliegenden Fakten untermauern erneut die hohe Allogenität des Mausmodells. Für MNA 715 könnten sich somit im Menschen bereits niedrigere Dosen als therapeutisch wirksam erweisen.

Im RNase Protection Assay zeigten sich 5 Tage nach HTx im Vergleich zur allogenen Kontrolle, sowohl unter MNA 715 (20 mg/kg/die) als auch unter FK 506 (3 mg/kg/die), deutlich niedrigere mRNA-Spiegel für alle nachgewiesenen Zyto- und Chemokine (vgl. 3.1.3.). Unter FK 506 wurden auch 15 Tage nach Transplantation ähnlich niedrige Werte gemessen. Im Gegensatz dazu zeigten sich unter MNA 715 zum selben Zeitpunkt für Mip-2, Mip-1- $\alpha$ , Mip-1- $\beta$ , TNF und IP 10 Werte, die denen der allogenen Kontrollgruppe 5 Tage nach Transplantation entsprechen. Für RANTES wurden sogar Werte gemessen, die über denen der allogenen Kontrolle nach 5 Tagen liegen. Für IL 10, IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  lagen die gemessenen mRNA-Werte auch nach 15 Tagen auf ähnlichem Niveau wie 5 Tage nach Transplantation, ohne sich statistisch signifikant von denen der allogenen Kontrolle 5 Tage post HTx zu unterscheiden. Die vorliegenden Ergebnisse stehen in Einklang mit Daten aus Experimenten mit A77 1726, dem Leflunomid Hauptmetaboliten. Für A77 1726 konnte gezeigt werden, daß es in antipro-

liferativ wirksamen Konzentrationen die Zytokin-Synthese oder die Expression von Zytokin-Rezeptoren kaum beeinflusst (30, 82, 163). Diese Daten werden durch die Beobachtung unterstützt, daß sich die antiproliferativen Eigenschaften von A77 1726 durch IL-2, IL-4 oder IL-10 nicht antagonisieren lassen (27). Dennoch korrelieren bestimmte Chemokinmuster eng mit einer akuten Abstoßung. Dies gilt unter anderem für IP-10 und IL-1 $\beta$ , welche bereits früh nach allogener Transplantation ansteigen. MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES steigen hingegen zeitlich leicht verzögert an (4, 49, 57, 76, 79, 115, 158). Auch für TNF gibt es Hinweise auf einen direkten Zusammenhang mit einer akuten Abstoßung (1, 84). Im vorliegenden Fall korrelieren die erhöhten mRNA-Spiegel der genannten Chemo- bzw. Zytokine unter Immunsuppression mit MNA 715 nicht mit der Überlebenskinetik der Herzen. Trotzdem muß davon ausgegangen werden, daß sie ein Korrelat der in der Immunhistologie gezeigten Abstoßung als Ausdruck einer unzureichenden Immunsuppression darstellen. Eine weitere Erhöhung der Dosis von MNA 715 (> 20mg/kg/die) führte jedoch zum Tod der Tiere infolge therapieassoziierter Nebenwirkungen.

Von Leflunomid wird angenommen, daß der Hauptwirkmechanismus von der applizierten Dosis abhängig ist. In niedriger Dosierungen solle es demnach hauptsächlich über die Hemmung der DHODH und somit global antiproliferativ wirken. Dieser Wirkmechanismus ist einer Antagonisierung durch Uridin oder Cytidin zugänglich, d.h. eine gemeinsame Applikation von Leflunomid und Uridin bzw. Cytidin *in vivo* ermöglicht höhere Leflunomiddosen (22, 27, 102, 103, 154). In höherer Dosierung scheint die immunsuppressive Wirkung von Leflunomid v.a. auf der Hemmung von Tyrosin-Kinasen zu basieren. Dieser Effekt ist einer Hemmung durch Gabe von Kernbasen nicht zugänglich (157). Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, daß durch gleichzeitige Gabe von Uridin (500 mg/kg/die *i.p.*) und Leflunomid (35 mg/kg/die *p.o.*) eine Abstoßung von allogenen Herztransplantaten zuverlässig verhindert werden konnte. Unter Dosen von 5 bis 15 mg/kg/die kam es dabei zu histologischen Veränderungen im Sinne einer Abstoßung. 35 mg/kg/die ohne zusätzliche Gabe von Uridin führten zum Tod der Tiere (31). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß der *in vivo* entscheidende Wirkmechanismus von Leflunomid in der Hemmung von Tyrosin-Kinasen liegt. Dies könnte bedeuten, daß sich auch für MNA 715 durch gleichzeitige Gabe von Uridin höhere *in vivo* Dosen erzielen lassen, welche dann ebenfalls über eine Hemmung von Tyrosin-Kinasen zu einer effektiven Immunsuppression führen.

Die gezeigten Ergebnisse der vorliegenden Dissertation lassen MNA 715 als potentes Immunsuppressivum erscheinen. Es ist allerdings auch klar ersichtlich, daß es als Monotherapeuti-

kum zumindest im verwendeten Mausmodell zu keiner suffizienten Immunsuppression führt. Um einen tieferen Einblick in die möglichen Wirkmechanismen von MNA 715 zu erhalten, sind weitere Versuche notwendig, die derzeit in unserem Labor durchgeführt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit dem neuartigen Immunsuppressivum Malononitrilamid 715 (MNA 715), einem Strukturanalogon zu A77 1726, dem Hauptmetaboliten von Leflunomid. Malononitrilamide wurden insbesondere als Ersatzsubstanz für Leflunomid entwickelt, welches im Menschen eine sehr lange Halbwertszeit aufweist und daher in der Immunsuppression nach Transplantation, die oft eine rasche Dosisanpassung erfordert, nicht eingesetzt werden kann. Um eine Vorstellung über die Potenz dieser Wirkstoffklasse zu erhalten, wurde im Modell der heterotopen Herztransplantation in der Maus eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt. Zusätzlich wurden die transplantierten Herzen zu definierten Zeitpunkten einer *in vitro* Untersuchung unterzogen. Hierzu wurden Gefrierschnitte sowohl konventionell als auch immunhistologisch gefärbt. Zudem wurde mRNA aus den Organen gewonnen und durch ein RNase Protektion Assay auf bestimmte Chemo- und Zytokine hin untersucht.

Es zeigte sich, daß MNA 715 in der Lage ist, das Organüberleben nach allogener heterotoper Herztransplantation (HTx) dosisabhängig zu verlängern. Durch temporäre Applikation von 20 mg/kg/die MNA 715 per os über einen Zeitraum von 21 Tagen konnte sogar zu 30% Langzeitüberleben von über 100 Tagen erreicht werden. Allerdings zeigte die histologische Untersuchung der Organe, daß zu diesem Zeitpunkt alle Herzen deutliche Zeichen einer Abstoßung aufwiesen (Grad 4 nach Billingham). Im Vergleich zur allogenen Kontrolle traten Veränderungen im Sinne einer akuten Abstoßung zeitlich deutlich verzögert, jedoch auch unter Gabe von MNA 715 auf. Sowohl unter dem Gesichtspunkt des Transplantatüberlebens, als auch in der Histologie zeigte sich FK 506, ein klinisch bereits etabliertes Immunsuppressivum, weniger effektiv als MNA 715. Dies deutet darauf hin, daß das verwendete Tiermodell (HTx BALB/c → C57BL/6) als streng allogenes einzuschätzen ist. Im RNase Protektion Assay waren 5 Tage nach HTx alle nachgewiesenen Chemo- und Zytokine im Vergleich zur allogenen Kontrolle supprimiert. Dies konnte sowohl für MNA 715 als auch für FK 506 gezeigt werden. Nach 15 Tagen gilt dies nur noch für FK 506. Unter MNA 715 wurden zu diesem Zeitpunkt Werte gemessen, die sich nicht signifikant von denen der allogenen Kontrolle 5 Tage nach Transplantation unterscheiden. Diese Daten stehen in Einklang mit Ergebnissen, die für Leflunomid vorliegen und zeigen, daß Leflunomid in antiproliferativen Dosen die Chemo- bzw. Zytokin-Synthese kaum beeinflusst.

Insgesamt konnten für MNA 715 klare Parallelen zur Wirkungsweise von Leflunomid gefunden werden. Zum einen sind die gefundenen Nebenwirkungen mit denen identisch, die für andere Inhibitoren der Dihydroorotat-Dehydrogenase gefunden wurden. Zum anderen deuten die aus dem RNase Protektion Assay gewonnen Ergebnisse darauf hin, daß MNA 715 in der verwendeten Dosis (bis max. 20 mg/kg/die) wie Leflunomid die Synthese von Chemo- bzw. Zytokinen nahezu unbeeinflusst läßt.

MNA 715 zeigte sich in der Maus insbesondere im Vergleich mit FK 506 und Cyclosporin A als potentes Immunsuppressivum, obwohl bei zeitlich limitierter Gabe (Tag 0 bis 20 post HTx) keine Akzeptanz der Herztransplantate erzielt werden konnte. Seine relativ geringe therapeutische Breite führte jedoch schon bei Dosen von 30 mg/kg/die zum Auftreten therapieassoziierter Nebenwirkungen. Diese Tatsache könnte den Einsatz von MNA 715 in der Immunsuppression nach Organtransplantation im Menschen limitieren. Weiter Versuche werden notwendig sein, um die ganze Breite der Wirkungsweise dieser immunsuppressiv wirksamen Substanz zu verstehen und die Frage zu klären, ob sich MNA 715 wirklich nur in seiner Halbwertszeit von Leflunomid unterscheidet.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abdallah, A.N., P. Cucchi-Mouillot, N. Biteau, A. Cassaigne, D. Haras and A. Iron. 1999. Analysis of the polymorphism of the tumour necrosis factor (TNF) gene and promoter and of circulating TNF-alpha levels in heart-transplant patients suffering or not suffering from severe rejection. *Eur J Immunogenet.* 26: 249-55.
2. Almond, P.S., A. Matas, K. Gillingham, D.L. Dunn, W.D. Payne, P. Gores, R. Gruessner and J.S. Najarian. 1993. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation.* 55: 752-6; discussion 756-7.
3. Anton, L.C., J.W. Yewdell and J.R. Bennink. 1997. MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies. *J Immunol.* 158: 2535-42.
4. Azzawi, M., P.S. Hasleton, P.J. Geraghty, N. Yonan, P. Krysiak, A. El-Gammal, A.K. Deiraniya and I.V. Hutchinson. 1998. RANTES chemokine expression is related to acute cardiac cellular rejection and infiltration by CD45RO T-lymphocytes and macrophages. *J Heart Lung Transplant.* 17: 881-7.
5. Baggiolini, M., A. Walz and S.L. Kunkel. 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 84: 1045-9.
6. Barrett, M., A.D. Milton, J. Barrett, D. Taube, M. Bewick, V.P. Parsons and J.W. Fabre. 1987. Needle biopsy evaluation of class II major histocompatibility complex antigen expression for the differential diagnosis of cyclosporine nephrotoxicity from kidney graft rejection. *Transplantation.* 44: 223-7.
7. Bartlett, R.R. and R. Schleyerbach. 1985. Immunopharmacological profile of a novel isoxazol derivative, HWA 486, with potential antirheumatic activity--I. Disease modifying action on adjuvant arthritis of the rat. *Int J Immunopharmacol.* 7: 7-18.
8. Basham, T.Y. and T.C. Merigan. 1983. Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. *J Immunol.* 130: 1492-4.
9. Bass, H., T. Mosmann and S. Strober. 1989. Evidence for mouse Th1- and Th2-like helper T cells in vivo. Selective reduction of Th1-like cells after total lymphoid irradiation. *J Exp Med.* 170: 1495-511.
10. Bijur, S. 1996. Current concepts in the immunology of allograft rejection. *Indian J Med Sci.* 50: 13-9.
11. Billingham, M.E. 1995. Pathology of human cardiac transplantation. *Monogr Pathol.* 37: 108-28.

12. Binder, J., M. Lehmann, E. Graser, W.W. Hancock, B. Watschinger, K. Onodera, M.H. Sayegh, H.D. Volk and J.W. Kupiec-Weglinski. 1996. The effects of nondepleting CD4 targeted therapy in presensitized rat recipients of cardiac allografts. *Transplantation*. 61: 804-11.
13. Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger and D.C. Wiley. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*. 329: 512-8.
14. Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger and D.C. Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 329: 506-12.
15. Boise, L.H., A.J. Minn, P.J. Noel, C.H. June, M.A. Accavitti, T. Lindsten and C.B. Thompson. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. 3: 87-98.
16. Boise, L.H., P.J. Noel and C.B. Thompson. 1995. CD28 and apoptosis. *Curr Opin Immunol*. 7: 620-5.
17. Bradley, J.A., D.W. Mason and P.J. Morris. 1985. Evidence that rat renal allografts are rejected by cytotoxic T cells and not by nonspecific effectors. *Transplantation*. 39: 169-75.
18. Brown, J.H., T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, L.J. Stern, R.G. Urban, J.L. Strominger and D.C. Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 [see comments]. *Nature*. 364: 33-9.
19. Buer, J., I. Aifantis, J.P. DiSanto, H.J. Fehling and H. von Boehmer. 1997. Role of different T cell receptors in the development of pre-T cells. *J Exp Med*. 185: 1541-7.
20. Cantrell, D.A. and K.A. Smith. 1983. Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. *J Exp Med*. 158: 1895-911.
21. Cao, W.W., P.N. Kao, Y. Aoki, J.C. Xu, R.A. Shorthouse and R.E. Morris. 1996. A novel mechanism of action of the immunomodulatory drug, leflunomide: augmentation of the immunosuppressive cytokine, TGF-beta 1, and suppression of the immunostimulatory cytokine, IL-2. *Transplant Proc*. 28: 3079-80.
22. Cao, W.W., P.N. Kao, A.C. Chao, P. Gardner, J. Ng and R.E. Morris. 1995. Mechanism of the antiproliferative action of leflunomide. A77 1726, the active metabolite of leflunomide, does not block T-cell receptor-mediated signal transduction but its antiproliferative effects are antagonized by pyrimidine nucleosides. *J Heart Lung Transplant*. 14: 1016-30.

23. Cerdan, C., Y. Martin, M. Courcoul, H. Brailly, C. Mawas, F. Birg and D. Olive. 1992. Prolonged IL-2 receptor alpha/CD25 expression after T cell activation via the adhesion molecules CD2 and CD28. Demonstration of combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J Immunol.* 149: 2255-61.
24. Cerdan, C., Y. Martin, M. Courcoul, C. Mawas, F. Birg and D. Olive. 1995. CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor. *Res Immunol.* 146: 164-8.
25. Cerdan, C., Y. Martin, M. Courcoul, C. Mawas, F. Birg and D. Olive. 1995. CD28 costimulation up-regulates long-term IL-2R beta expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J Immunol.* 154: 1007-13.
26. Cerdan, C., D. Razanajaona, Y. Martin, M. Courcoul, C. Pavon, C. Mawas, D. Olive and F. Birg. 1992. Contributions of the CD2 and CD28 T lymphocyte activation pathways to the regulation of the expression of the colony-stimulating factor (CSF-1) gene. *J Immunol.* 149: 373-9.
27. Cherwinski, H.M., D. McCarley, R. Schatzman, B. Devens and J.T. Ransom. 1995. The immunosuppressant leflunomide inhibits lymphocyte progression through cell cycle by a novel mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 272: 460-8.
28. Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 15: 532-4, 536-7.
29. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-9.
30. Chong, A.S., A. Finnegan, X. Jiang, H. Gebel, H.N. Sankary, P. Foster and J.W. Williams. 1993. Leflunomide, a novel immunosuppressive agent. The mechanism of inhibition of T cell proliferation. *Transplantation.* 55: 1361-6.
31. Chong, A.S., W. Huang, W. Liu, J. Luo, J. Shen, W. Xu, L. Ma, L. Blinder, F. Xiao, X. Xu, C. Clardy, P. Foster and J.A. Williams. 1999. In vivo activity of leflunomide: pharmacokinetic analyses and mechanism of immunosuppression. *Transplantation.* 68: 100-9.
32. Clipstone, N.A. and G.R. Crabtree. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* 357: 695-7.
33. Collins, B.H., M.L. Areford, M.A. Fabian, B.D. Jaffee and R.R. Bollinger. 1993. Brequinar sodium potentiates the effects of cyclosporine in experimental small bowel transplantation. *Transplant Proc.* 25: 37-9.

34. Cosenza, C.A., D.V. Cramer, G. Eiras-Hreha, E. Cajulis, H.K. Wang and L. Makowka. 1993. The synergism of brequinar sodium and cyclosporine used in combination to prevent cardiac allograft rejection in the rat. *Transplantation*. 56: 667-72.
35. Cramer, D.V., F.A. Chapman, B. Jaffee, E.A. Jones and L. Makowka. 1993. Inhibition of the pyrimidine biosynthetic pathway with S-8660, an analogue of brequinar sodium, prolongs cardiac allograft survival in rats. *J Heart Lung Transplant*. 12: 140-6.
36. Cramer, D.V., F.A. Chapman, B.D. Jaffee, E.A. Jones, M. Knoop, G. Hreha-Eiras and L. Makowka. 1992. The effect of a new immunosuppressive drug, brequinar sodium, on heart, liver, and kidney allograft rejection in the rat. *Transplantation*. 53: 303-8.
37. Czech, J., H.U. Schorlemmer and W. Schwab. 1996. Effect of malononitrilamides on human bone marrow. *Transplant Proc*. 28: 3051-2.
38. Czitrom, A.A. 1996. The immune response: the afferent arm. *Clin Orthop*. 11-24.
39. Daar, A.S., S.V. Fuggle, J.W. Fabre, A. Ting and P.J. Morris. 1984. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation*. 38: 287-92.
40. Daar, A.S., S.V. Fuggle, J.W. Fabre, A. Ting and P.J. Morris. 1984. The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. *Transplantation*. 38: 293-8.
41. Dai, Z. and F.G. Lakkis. 1999. The role of cytokines, CTLA-4 and costimulation in transplant tolerance and rejection. *Curr Opin Immunol*. 11: 504-8.
42. Dausset, J. 1981. The major histocompatibility complex in man. *Science*. 213: 1469-74.
43. Davis, J.P., G.A. Cain, W.J. Pitts, R.L. Magolda and R.A. Copeland. 1996. The immunosuppressive metabolite of leflunomide is a potent inhibitor of human dihydroorotate dehydrogenase. *Biochemistry*. 35: 1270-3.
44. Daynes, R.A., B.A. Araneo, T.A. Dowell, K. Huang and D. Dudley. 1990. Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J Exp Med*. 171: 979-96.
45. Deng, Y., J.W. Yewdell, L.C. Eisenlohr and J.R. Bennink. 1997. MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL. *J Immunol*. 158: 1507-15.

46. Dmoszynska, A. and J. Rolinski. 1995. [Interleukin 2 receptor (II-2): structure and function]. *Acta Haematol Pol.* 26: 257-62.
47. Dresske, B., X. Zhu, C. Herwartz, K. Brotzmann and F. Fandrich. 1997. The time pattern of organ infiltration and distribution of natural killer cells and macrophages in the course of acute graft rejection after allogeneic heart transplantation in the rat. *Transplant Proc.* 29: 1715-6.
48. Dumont, F.J., M.J. Staruch, S.L. Koprak, M.R. Melino and N.H. Sigal. 1990. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol.* 144: 251-8.
49. Fairchild, R.L., A.M. VanBuskirk, T. Kondo, M.E. Wakely and C.G. Orosz. 1997. Expression of chemokine genes during rejection and long-term acceptance of cardiac allografts. *Transplantation.* 63: 1807-12.
50. Finkelstein, F.O., N.J. Siegel, C. Bastl, J.N. Forrest, Jr. and M. Kashgarian. 1976. Kidney transplant biopsies in the diagnosis and management of acute rejection reactions. *Kidney Int.* 10: 171-8.
51. Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, P. Vieira, T.R. Mosmann, M. Howard, K.W. Moore and A. O'Garra. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* 146: 3444-51.
52. Fishbein, M.C., G. Bell, M.A. Lones, L.S. Czer, J.M. Miller, D. Harasty and A. Trento. 1994. Grade 2 cellular heart rejection: does it exist? [see comments]. *J Heart Lung Transplant.* 13: 1051-7.
53. Forbes, R.D., R.A. Rowan and M.E. Billingham. 1990. Endocardial infiltrates in human heart transplants: a serial biopsy analysis comparing four immunosuppression protocols [see comments]. *Hum Pathol.* 21: 850-5.
54. Fraser, J.D., B.A. Irving, G.R. Crabtree and A. Weiss. 1991. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science.* 251: 313-6.
55. Fruman, D.A., C.B. Klee, B.E. Bierer and S.J. Burakoff. 1992. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 3686-90.
56. Fuggle, S.V., D.L. McWhinnie, J.R. Chapman, H.M. Taylor and P.J. Morris. 1986. Sequential analysis of HLA-class II antigen expression in human renal allografts. Induction of tubular class II antigens and correlation with clinical parameters. *Transplantation.* 42: 144-50.

57. Grau, V., D. Gemsa, B. Steiniger and H. Garn. 2000. Chemokine expression during acute rejection of rat kidneys [In Process Citation]. *Scand J Immunol.* 51: 435-40.
58. Greene, S., K. Watanabe, J. Braatz-Trulson and L. Lou. 1995. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide. *Biochem Pharmacol.* 50: 861-7.
59. Greene, W.C., J.M. Depper, M. Kronke and W.J. Leonard. 1986. The human interleukin-2 receptor: analysis of structure and function. *Immunol Rev.* 92: 29-48.
60. Gubernatis, G., J. Kemnitz, A. Bornscheuer, E.R. Kuse and R. Pichlmayr. 1989. Potential various appearances of hyperacute rejection in human liver transplantation. *Langenbecks Arch Chir.* 374: 240-4.
61. Hall, B.M. 1991. Cells mediating allograft rejection [published erratum appears in *Transplantation* 1991 Nov;52(5):936]. *Transplantation.* 51: 1141-51.
62. Hancock, W.W., M.H. Sayegh, C.A. Kwok, H.L. Weiner and C.B. Carpenter. 1993. Oral, but not intravenous, alloantigen prevents accelerated allograft rejection by selective intragraft Th2 cell activation. *Transplantation.* 55: 1112-8.
63. Harris, H.W. and T.J.d. Gill. 1986. Expression of class I transplantation antigens. *Transplantation.* 42: 109-17.
64. Henry, E., J.R. Monties, A. Mouly-Bandini, A. Goudard, D. Blin, T. Mesana, C. Avierinos, R. Choux and N. Gros. 1994. Greater than 18-year follow-up after cardiac transplantation: clinical report and pathological findings. *Transplant Proc.* 26: 249.
65. Heublein, B., A. Haverich and H.G. Borst. 1990. Long-term follow-up after orthotopic heart transplantation. *Thorac Cardiovasc Surg.* 38: 285-90.
66. Honbo, T., M. Kobayashi, K. Hane, T. Hata and Y. Ueda. 1987. The oral dosage form of FK-506. *Transplant Proc.* 19: 17-22.
67. Hood, L., M. Steinmetz and R. Goodenow. 1982. Genes of the major histocompatibility complex. *Cell.* 28: 685-7.
68. Hood, L., M. Steinmetz, R. Goodenow, K. Eakle, D. Fisher, J. Koberi, B. Malissen, M. Malissen, M. McMillan, J. McNicholas, A. Orn, M. Pecht, B.T. Sher, L. Smith, I. Stroynowski, H. Sun, A. Winoto and M. Zuniga. 1983. Genes of the major histocompatibility complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 47: 1051-65.
69. Hood, L., M. Steinmetz and B. Malissen. 1983. Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. *Annu Rev Immunol.* 1: 529-68.

70. Hosenpud, J.D., K.A. Mauck and K.B. Hogan. 1997. Cardiac allograft vasculopathy: IgM antibody responses to donor-specific vascular endothelium. *Transplantation*. 63: 1602-6.
71. Hosenpud, J.D., T.E. Morris, G.D. Shipley, K.A. Mauck and C.R. Wagner. 1996. Cardiac allograft vasculopathy. Preferential regulation of endothelial cell-derived mesenchymal growth factors in response to a donor-specific cell-mediated allogeneic response. *Transplantation*. 61: 939-48.
72. Jaffee, B.D., E.A. Jones, S.E. Loveless and S.F. Chen. 1993. The unique immunosuppressive activity of brequinar sodium. *Transplant Proc*. 25: 19-22.
73. Jain, A.B., J.J. Fung, A.G. Tzakis, R. Venkataramanan, K. Abu-Elmagd, M. Alessiani, J. Reyes, W. Irish, V. Warty, S. Mehta and et al. 1991. Comparative study of cyclosporine and FK 506 dosage requirements in adult and pediatric orthotopic liver transplant patients. *Transplant Proc*. 23: 2763-6.
74. Jain, A.B., J.J. Fung, R. Venkataramanan, S. Todo, M. Alessiani and T.E. Starzl. 1990. FK 506 dosage in human organ transplantation. *Transplant Proc*. 22: 23-4.
75. Jardetzky, T.S., J.H. Brown, J.C. Gorga, L.J. Stern, R.G. Urban, Y.I. Chi, C. Stauffacher, J.L. Strominger and D.C. Wiley. 1994. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*. 368: 711-8.
76. Kapoor, A., K. Morita, T.M. Engeman, E.M. Vapnek, M. Hobart, A.C. Novick and R.L. Fairchild. 2000. Intragraft expression of chemokine gene occurs early during acute rejection of allogeneic cardiac grafts [In Process Citation]. *Transplant Proc*. 32: 793-5.
77. Keene, J.A. and J. Forman. 1982. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. 155: 768-82.
78. Kissmeyer-Nielsen, F., S. Olsen, V.P. Petersen and O. Fjeldborg. 1966. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*. 2: 662-5.
79. Kondo, T., A.C. Novick, H. Toma and R.L. Fairchild. 1996. Induction of chemokine gene expression during allogeneic skin graft rejection. *Transplantation*. 61: 1750-7.
80. Kruisbeek, A.M. 1993. Development of alpha beta T cells. *Curr Opin Immunol*. 5: 227-34.
81. Lajoie, G., T. Nadasdy, Z. Laszik, K.E. Blick and F.G. Silva. 1996. Mast cells in acute cellular rejection of human renal allografts. *Mod Pathol*. 9: 1118-25.

82. Lang, R., H. Wagner and K. Heeg. 1995. Differential effects of the immunosuppressive agents cyclosporine and leflunomide in vivo. Leflunomide blocks clonal T cell expansion yet allows production of lymphokines and manifestation of T cell-mediated shock. *Transplantation*. 59: 382-9.
83. Lehtonen, S.R., H.M. Isoniemi, K.T. Salmela, E.I. Taskinen, E.O. von Willebrand, J.P. Ahonen and E.O. vWillebrand. 1997. Long-term graft outcome is not necessarily affected by delayed onset of graft function and early acute rejection [published erratum appears in *Transportation* 1998 Sep 15;66(5):678]. *Transplantation*. 64: 103-7.
84. Li, Z., Y. Liu and Y. Feng. 1997. [The role of TNF alpha in the allograft rejection of orthotopic rat liver transplantation]. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih*. 77: 134-7.
85. Lindner, J.K. and N. Zantl. 1998. Synergism of the malononitrilamides 279 and 715 with cyclosporine A in the induction of long-term cardiac allograft survival. *Transpl Int*. 11: S303-9.
86. Liu, J., J.D. Farmer, Jr., W.S. Lane, J. Friedman, I. Weissman and S.L. Schreiber. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 66: 807-15.
87. Lowry, R.P., R.D. Forbes, J.H. Blackburn and D.M. Marghesco. 1985. Immune mechanisms in organ allograft rejection. V. Pivotal role of the cytotoxic-suppressor T cell subset in the rejection of heart grafts bearing isolated class I disparities in the inbred rat. *Transplantation*. 40: 545-50.
88. Luster, A.D. and J.V. Ravetch. 1987. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med*. 166: 1084-97.
89. Macatonia, S.E., P.M. Taylor, S.C. Knight and B.A. Askonas. 1989. Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. *J Exp Med*. 169: 1255-64.
90. Makowka, L., F. Chapman and D.V. Cramer. 1993. Historical development of brequinar sodium as a new immunosuppressive drug for transplantation. *Transplant Proc*. 25: 2-7.
91. Matas, A.J., K.J. Gillingham, W.D. Payne and J.S. Najarian. 1994. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation*. 57: 857-9.
92. Matsushima, K., C.G. Larsen, G.C. DuBois and J.J. Oppenheim. 1989. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med*. 169: 1485-90.

93. Meuer, S.C., D.A. Cooper, J.C. Hodgdon, R.E. Hussey, K.A. Fitzgerald, S.F. Schlossman and E.L. Reinherz. 1983. Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes. *Science*. 222: 1239-42.
94. Miller, M.D. and M.S. Krangel. 1992. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol*. 12: 17-46.
95. Milton, A.D., S.C. Spencer and J.W. Fabre. 1986. The effects of cyclosporine on the induction of donor class I and class II MHC antigens in heart and kidney allografts in the rat. *Transplantation*. 42: 337-47.
96. Minami, Y., T. Kono, T. Miyazaki and T. Taniguchi. 1993. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol*. 11: 245-68.
97. Morris, R.E., X. Huang, W. Cao, B. Zheng and R.A. Shorthouse. 1995. Leflunomide (HWA 486) and its analog suppress T- and B-cell proliferation in vitro, acute rejection, ongoing rejection, and antidonor antibody synthesis in mouse, rat, and cynomolgus monkey transplant recipients as well as arterial intimal thickening after balloon catheter injury. *Transplant Proc*. 27: 445-7.
98. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin and R.L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 136: 2348-57.
99. Mosmann, T.R. and K.W. Moore. 1991. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today*. 12: A49-53.
100. Mosmann, T.R. and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more [see comments]. *Immunol Today*. 17: 138-46.
101. Murase, N., T.E. Starzl, A.J. Demetris, L. Valdivia, M. Tanabe, D. Cramer and L. Makowka. 1993. Hamster-to-rat heart and liver xenotransplantation with FK506 plus antiproliferative drugs. *Transplantation*. 55: 701-7; discussion 707-8.
102. Nair, R.V., W. Cao and R.E. Morris. 1996. The antiproliferative effect of leflunomide on vascular smooth muscle cells in vitro is mediated by selective inhibition of pyrimidine biosynthesis. *Transplant Proc*. 28: 3081.
103. Nair, R.V., W. Cao and R.E. Morris. 1995. Inhibition of smooth muscle cell proliferation in vitro by leflunomide, a new immunosuppressant, is antagonized by uridine. *Immunol Lett*. 48: 77-80.

104. Nakhleh, R.E., S.J. Schwarzenberg, J. Bloomer, W. Payne and D.C. Snover. 1990. The pathology of liver allografts surviving longer than one year [see comments]. *Hepatology*. 11: 465-70.
105. Nickerson, P., W. Steurer, J. Steiger, X. Zheng, A.W. Steele and T.B. Strom. 1994. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol*. 6: 757-64.
106. Noel, P.J., L.H. Boise, J.M. Green and C.B. Thompson. 1996. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol*. 157: 636-42.
107. Noel, P.J., L.H. Boise and C.B. Thompson. 1996. Regulation of T cell activation by CD28 and CTLA4. *Adv Exp Med Biol*. 406: 209-17.
108. Normann, S.J., S.R. Khan, P. Leelachaikul and D.R. Salomon. 1992. Origin of cells in the coronary intima during acute vascular rejection of the transplanted human heart [see comments]. *J Heart Lung Transplant*. 11: 492-9.
109. O'Keefe, S.J., J. Tamura, R.L. Kincaid, M.J. Tocci and E.A. O'Neill. 1992. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature*. 357: 692-4.
110. Oppenheim, J.J., C.O. Zachariae, N. Mukaida and K. Matsushima. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*. 9: 617-48.
111. Palladino, M.A., R.E. Morris, H.F. Starnes and A.D. Levinson. 1990. The transforming growth factor-betas. A new family of immunoregulatory molecules. *Ann N Y Acad Sci*. 593: 181-7.
112. Papp, I., K.J. Wieder, T. Sablinski, P.J. O'Connell, E.L. Milford, T.B. Strom and J.W. Kupiec-Weglinski. 1992. Evidence for functional heterogeneity of rat CD4+ T cells in vivo. Differential expression of IL-2 and IL-4 mRNA in recipients of cardiac allografts. *J Immunol*. 148: 1308-14.
113. Parnes, J.R. 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol*. 44: 265-311.
114. Patel, R. and P.I. Terasaki. 1969. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 280: 735-9.
115. Pattison, J., P.J. Nelson, P. Huie, I. von Leutlichau, G. Farshid, R.K. Sibley and A.M. Krensky. 1994. RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney [see comments]. *Lancet*. 343: 209-11.

116. Peters, G.J., J.C. Nadal, E.J. Laurensse, E. de Kant and H.M. Pinedo. 1990. Retention of in vivo antiprimidine effects of Brequinar sodium (DUP-785; NSC 368390) in murine liver, bone marrow and colon cancer. *Biochem Pharmacol.* 39: 135-44.
117. Piccotti, J.R., S.Y. Chan, R.E. Goodman, J. Magram, E.J. Eichwald and D.K. Bishop. 1996. IL-12 antagonism induces T helper 2 responses, yet exacerbates cardiac allograft rejection. Evidence against a dominant protective role for T helper 2 cytokines in alloimmunity. *J Immunol.* 157: 1951-7.
118. Pichler, W.J. 1997. [Regulation of the immune response: the TH1/TH2 concept]. *Schweiz Med Wochenschr.* 127: 341-8.
119. Pober, J.S., M.A. Gimbrone, Jr., R.S. Cotran, C.S. Reiss, S.J. Burakoff, W. Fiers and K.A. Ault. 1983. Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human gamma interferon. *J Exp Med.* 157: 1339-53.
120. Popovic, S. and R.R. Bartlett. 1986. Disease modifying activity of HWA 486 on the development of SLE in MRL/1-mice. *Agents Actions.* 19: 313-4.
121. Portmann, B., G.I. Slapak, E. Gane and R. Williams. 1995. Pathology and biopsy diagnosis of the transplanted liver. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 79: 277-90.
122. Qi, Z. and H. Ekberg. 1998. Malononitrilamides 715 and 279 prolong rat cardiac allograft survival, reverse ongoing rejection, inhibit allospecific antibody production and interact positively with cyclosporin. *Scand J Immunol.* 48: 379-88.
123. Qi, Z., M. Simanaitis and H. Ekberg. 1998. Malononitrilamides 715 and 279 prevent accelerated cardiac allograft rejection synergistically with cyclosporin A in presensitized rats. *Transpl Immunol.* 6: 94-100.
124. Reinherz, E.L., S. Meuer, K.A. Fitzgerald, R.E. Hussey, H. Levine and S.F. Schlossman. 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. *Cell.* 30: 735-43.
125. Rollins, B.J., E.D. Morrison and C.D. Stiles. 1988. Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 3738-42.
126. Rollins, B.J., T. Yoshimura, E.J. Leonard and J.S. Pober. 1990. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol.* 136: 1229-33.
127. Salgame, P., J.S. Abrams, C. Clayberger, H. Goldstein, J. Convit, R.L. Modlin and B.R. Bloom. 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 254: 279-82.

128. Sankary, H.N., D.P. Yin, A.S. Chong, L.L. Ma, L. Blinder, J.K. Shen, P. Foster and J.W. Williams. 1998. FK506 treatment in combination with leflunomide in hamster-to-rat heart and liver xenograft transplantation. *Transplantation*. 66: 832-7.
129. Schall, T.J., M. Lewis, K.J. Koller, A. Lee, G.C. Rice, G.H. Wong, T. Gatanaga, G.A. Granger, R. Lentz, H. Raab and et al. 1990. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*. 61: 361-70.
130. Schlitt, H.J., B. Nashan, B. Ringe, H. Bunzendahl, C. Wittekind, K. Wonigeit and R. Pichlmayr. 1991. Differentiation of liver graft dysfunction by transplant aspiration cytology. *Transplantation*. 51: 786-93.
131. Schorlemmer, H.U. and R. Kurrle. 1997. Long-term xenograft survival by combination therapy of malononitrilamide MNA 715 with cyclosporine. *Transplant Proc*. 29: 3501-4.
132. Schorlemmer, H.U. and R. Kurrle. 1997. Synergistic activity of malononitrilamides with cyclosporine to control and reverse xenograft rejection. *Int J Tissue React*. 19: 149-56.
133. Schreiber, S.L. 1992. Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways. *Cell*. 70: 365-8.
134. Schultze, J., L.M. Nadler and J.G. Gribben. 1996. B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood Rev*. 10: 111-27.
135. Sher, A., R.T. Gazzinelli, I.P. Oswald, M. Clerici, M. Kullberg, E.J. Pearce, J.A. Berzofsky, T.R. Mosmann, S.L. James and H.C.d. Morse. 1992. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev*. 127: 183-204.
136. Siemasko, K.F., A.S. Chong, J.W. Williams, E.G. Bremer and A. Finnegan. 1996. Regulation of B cell function by the immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation*. 61: 635-42.
137. Sigal, N.H., C.S. Lin and J.J. Siekierka. 1991. Inhibition of human T-cell activation by FK 506, rapamycin, and cyclosporine A. *Transplant Proc*. 23: 1-5.
138. Silva Junior, H.T. and R.E. Morris. 1997. Leflunomide and malononitrilamides. *Am J Med Sci*. 313: 289-301.
139. Snover, D.C. 1993. General aspects of the pathology of rejection of kidney and liver in the early posttransplant period. *Transplant Proc*. 25: 2649-51.
140. Solez, K., R.A. Axelsen, H. Benediktsson, J.F. Burdick, A.H. Cohen, R.B. Colvin, B.P. Croker, D. Droz, M.S. Dunnill, P.F. Halloran and et al. 1993. International

- standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int.* 44: 411-22.
141. Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346: 425-34.
  142. Springer, T.A., M.L. Dustin, T.K. Kishimoto and S.D. Marlin. 1987. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol.* 5: 223-52.
  143. Steinmetz, M., A. Winoto, K. Minard and L. Hood. 1982. Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens. *Cell.* 28: 489-98.
  144. Steinmuller, D. 1985. Which T cells mediate allograft rejection? *Transplantation.* 40: 229-33.
  145. Street, N.E., J.H. Schumacher, T.A. Fong, H. Bass, D.F. Fiorentino, J.A. Leverah and T.R. Mosmann. 1990. Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J Immunol.* 144: 1629-39.
  146. Suzuki, N., S. Kaneko, M. Ichino, S. Mihara, S. Wakisaka and T. Sakane. 1997. In vivo mechanisms for the inhibition of T lymphocyte activation by long-term therapy with tacrolimus (FK-506): experience in patients with Behcet's disease. *Arthritis Rheum.* 40: 1157-67.
  147. Tilney, N.L. and J.W. Kupiec-Weglinski. 1991. The biology of acute transplant rejection. *Ann Surg.* 214: 98-106.
  148. Tilney, N.L., W.D. Whitley, J.R. Diamond, J.W. Kupiec-Weglinski and D.H. Adams. 1991. Chronic rejection--an undefined conundrum. *Transplantation.* 52: 389-98.
  149. van Ewijk, W. 1991. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol.* 9: 591-615.
  150. Veenstra, D.L., J.H. Best, J. Hornberger, S.D. Sullivan and D.E. Hricik. 1999. Incidence and long-term cost of steroid-related side effects after renal transplantation. *Am J Kidney Dis.* 33: 829-39.
  151. Watanabe, K., K. Konishi, M. Fujioka, S. Kinoshita and H. Nakagawa. 1989. The neutrophil chemoattractant produced by the rat kidney epithelioid cell line NRK-52E is a protein related to the KC/gro protein. *J Biol Chem.* 264: 19559-63.
  152. Wheelahan, J. and I.F. McKenzie. 1987. The role of T4+ and Ly-2+ cells in skin graft rejection in the mouse. *Transplantation.* 44: 273-80.

153. Williams, G.M., A.t. Haar, L.C. Parks and C.A. Krajewski. 1973. Endothelial changes associated with hyperacute, acute, and chronic renal allograft rejection in man. *Transplant Proc.* 5: 819-22.
154. Williamson, R.A., C.M. Yea, P.A. Robson, A.P. Curnock, S. Gadher, A.B. Hambleton, K. Woodward, J.M. Bruneau, P. Hambleton, D. Moss and et al. 1995. Dihydroorotate dehydrogenase is a high affinity binding protein for A77 1726 and mediator of a range of biological effects of the immunomodulatory compound. *J Biol Chem.* 270: 22467-72.
155. Winter, J.B., C. Clelland, A.S. Gouw and J. Prop. 1995. Distinct phenotypes of infiltrating cells during acute and chronic lung rejection in human heart-lung transplants. *Transplantation.* 59: 63-9.
156. Xu, X., J.W. Williams, E.G. Bremer, A. Finnegan and A.S. Chong. 1995. Inhibition of protein tyrosine phosphorylation in T cells by a novel immunosuppressive agent, leflunomide. *J Biol Chem.* 270: 12398-403.
157. Xu, X., J.W. Williams, H. Gong, A. Finnegan and A.S. Chong. 1996. Two activities of the immunosuppressive metabolite of leflunomide, A77 1726. Inhibition of pyrimidine nucleotide synthesis and protein tyrosine phosphorylation. *Biochem Pharmacol.* 52: 527-34.
158. Yamagami, S., D. Miyazaki, S.J. Ono and M.R. Dana. 1999. Differential chemokine gene expression in corneal transplant rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 2892-7.
159. Yeoh, T.K., W.H. Frist, T.E. Eastburn and J. Atkinson. 1992. Clinical significance of mild rejection of the cardiac allograft. *Circulation.* 86: II267-71.
160. Yi-qun, Z., R.J. Joost van Neerven, A. Kasran, M. de Boer and J.L. Ceuppens. 1996. Differential requirements for co-stimulatory signals from B7 family members by resting versus recently activated memory T cells towards soluble recall antigens. *Int Immunol.* 8: 37-44.
161. Yi-qun, Z., K. Lorre, M. de Boer and J.L. Ceuppens. 1997. B7-blocking agents, alone or in combination with cyclosporin A, induce antigen-specific anergy of human memory T cells. *J Immunol.* 158: 4734-40.
162. Zhong, G., C. Reis e Sousa and R.N. Germain. 1997. Production, specificity, and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide-major histocompatibility complex class II complexes formed by processing of exogenous protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 13856-61.

- 
163. Zielinski, T., H.J. Muller and R.R. Bartlett. 1993. Effects of leflunomide (HWA 486) on expression of lymphocyte activation markers. *Agents Actions*. 38: C80-2.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. C.-D. Heidecke für die interessante Themenstellung. Trotz seiner äußerst begrenzten Freizeit hat er sich unermüdlich am Entstehen dieser Dissertation beteiligt. Seine fachliche Kompetenz, sein Hilfsbereitschaft und sein ständiger Einsatz waren für das Gelingen der vorliegenden Dissertation unerlässlich. Mein ganz besonderer Dank gilt auch seiner Familie, die ihn angesichts zahlreicher, oft spät in den Abend reichender Besprechungen, im Laufe der letzten fünf Jahre oft entbehren mußte.

Weiterhin danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. K. Pfeffer, der nicht nur Tierställe, Versuchstiere, Arbeitsplatz und verschiedene Materialien für die ex vivo Untersuchungen bereitgestellt hat, sondern maßgeblich an Versuchsplanung, Durchführung und Auswertung der Experimente beigetragen hat.

Meinen beiden Betreuern, Herrn Dr. med. N. Zantl und Herrn Dr. med. S. Maier, danke ich für die Einführung in die mikrochirurgischen Arbeitsweisen, für die stets kollegiale Zusammenarbeit und für die maßgebliche Unterstützung bei den Experimenten.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Werner gilt ein besonderer Dank für die Hilfestellung bei der Auswertung der Histologie.

Meinem Mitdoktoranden Herrn M. Entleutner danke ich für die Unterstützung beim RNase Protection Assay.

Meinen Mitdoktoranden Frau N. Chambron, Frau C. Tertilt, Herrn M. Veit, Herrn E. Matevossain, Herrn N. Hüser, Herrn S. Wurzbacher und Herrn T. Träger danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft die zu einem sehr angenehmen Arbeitsklima beigetragen hat.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen der beteiligten Institute danke ich an dieser Stelle. Besonders erwähnt werden müssen in diesem Zusammenhang Frau S. Himpel, Frau T. Fleischmann und Frau T. Härig.

Stellvertretend für alle Mitarbeiter des Instituts für experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Gänsbacher und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Erhard. Stellvertretend für die OP-Pflegekräfte des Instituts danke ich Frau Pichotka. Sie haben dazu beigetragen den mikrochirurgischen Arbeitsplatz bereitzustellen und standen stets mit Rat und Tat zur Seite.

Vielen Dank meiner Familie, die mich in den letzten Jahren nicht nur über die Maßen finanziell sondern auch moralisch unterstützt hat und mir so oft über schwierige Phasen dieser Dissertation hinweggeholfen hat.