

**Einfluss von RNase A auf das Transplantatüberleben im
heterotop abdominellen Herztransplantationsmodell an
Ratten**

von Eike Christian Kleinert

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Einfluss von RNase A auf das Transplantatüberleben im
heterotop abdominellen Herztransplantationsmodell an
Ratten**

von Eike Christian Kleinert

aus Groß-Umstadt

München 2018

**Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Mitbetreuung durch:

Dr. Martin Langenmayer

und

PD Dr. Andreas Parzefall

Angefertigt am:

Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinikum Großhadern

Mentor: PD Dr. Elisabeth Deindl

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Birgit Viertelböck

Tag der Promotion: 10.02.2018

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Geschichte der Herztransplantation	3
2.	Transplantatabstoßung.....	6
2.1.	Hyperakute oder akzelerierte Transplantatabstoßung	6
2.2.	Akute Transplantatabstoßung.....	6
2.3.	Chronische Transplantatdysfunktion.....	7
3.	Behandlungsrichtlinien der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation (ISHLT).....	8
3.1.	Klassischer Therapieansatz	8
3.2.	Langzeit-Therapieansatz	8
3.3.	Therapieansatz bei hyperakuter Abstoßung	8
3.4.	Therapieansatz bei akuter Abstoßung	9
3.5.	Therapieansatz bei chronischer Abstoßung.....	9
4.	Ribonukleinsäure (RNA)	11
4.1.	Extrazelluläre RNA	11
5.	Ribonuklease.....	13
5.1.	Bovine Ribonuklease A.....	13
5.2.	Humane Ribonuklease 1.....	13
III.	EXPERIMENTELLES DESIGN UND ZIELSETZUNG	14
IV.	PUBLIKATION	18
V.	DISKUSSION	33
1.	Das Tiermodell.....	33
2.	Das Transplantationsmodell	34
3.	Ergebnisse	36
3.1.	Verträglichkeitsstudie.....	36
3.2.	Transplantatüberleben	37
3.3.	Leukozyteninfiltration	38

3.4.	Ischämie-/Reperfusionss-Schaden	40
3.5.	Ödembildung und Thrombusformierung	42
3.6.	Gemischte Lymphozytenreaktion	43
4.	Schlussfolgerung.....	44
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	46
VII.	SUMMARY.....	48
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	50
IX.	ANHANG	61
1.	Abbildungsverzeichnis	61
2.	Tabellenverzeichnis.....	61
3.	Anhangstabelle	62
X.	PUBLIKATIONSLISTE	63
XI.	DANKSAGUNG	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CI	<i>Confidence Interval</i> , Konfidenzintervall
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
eRNA	extrazelluläre RNA
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> , Durchflusszytometrie
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
i.v.	intravenös
ISHLT	<i>International Society for Heart and Lung Transplantation</i> , Internationale Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation
MMF	Mycophenolat Mofetil
mTOR- Inhibitor	<i>mechanistic Target Of Rapamycin</i> - Inhibitor
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalzlösung
OP	Operation
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
TVP	Transplantatvaskulopathie
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor- A</i>

I. EINLEITUNG

Im Falle einer finalen Herzerkrankung bleibt für viele Patienten als Therapie nur die Herztransplantation. Trotz der großen Fortschritte im Bereich der Transplantationsmedizin, insbesondere der immunsuppressiven Therapie, stellen Komplikationen wie Infektionen, akute und chronische Abstoßung, sowie vaskuläre Langzeitveränderungen im Sinne einer Transplantatvaskulopathie (TVP) immer noch eine deutliche Limitierung dar. Im Rahmen der Abstoßung nach Organtransplantation kommt es durch Bindung von Antikörpern an das Gefäßendothel im Transplantat zur Auslösung der Komplement- und Gerinnungskaskade. Als Folge kann es durch Thrombosierung, Entzündung und Endothelschäden zu akuten oder auch chronischen Transplantatabstoßungen kommen (Patel et al., 2011; Lund et al., 2014). Auch hyperakute systemische lebensbedrohliche Gerinnungsreaktionen können ablaufen. In Transplantat-Biopsien lassen sich je nach Schweregrad der Abstoßung neben Ödemen, Hämorrhagien und Vaskulitiden mit polymorphen Entzündungsinfiltraten bestehend aus Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und neutrophilen Granulozyten, verbunden mit Nekrosen und Schäden an den Myozyten nachweisen (Billingham et al., 1990; Stewart et al., 2005).

Im Rahmen von Gewebeschäden und Nekrose werden intrazelluläre Bestandteile wie auch Nukleinsäuren ins Plasma freigesetzt. Diese freigesetzte RNA wird als extrazelluläre RNA (eRNA) bezeichnet (Fischer et al., 2013). Das Auftreten von eRNA in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankungen und inflammatorischen Prozessen wurde in letzter Zeit mit Leukozytenrekrutierung durch eRNA-aktivierte proinflammatorische Zytokine (Fischer et al., 2012), eRNA-bedingte Steigerung der Gefäßpermeabilität und Ödembildung (Fischer et al., 2007) und Thrombusbildung, sowie Gefäßverschluss durch eRNA vermittelte Aktivierung des Kontaktphasesystems der intrinsischen Koagulation (Kannemeier et al., 2007) in Verbindung gebracht. All diese Mechanismen können zu der zerstörerischen Natur von eRNA in pathophysiologischen Situationen wie Arteriosklerose und Ischämie/Reperfusionsschädigung beitragen (Simsekylmaz et al., 2014; Cabrera-Fuentes et al., 2014).

Auf der Suche nach Substanzen oder Mechanismen, die der Abstoßungskonstellation Leukozyteninfiltration, Ödembildung und Thrombusbildung entgegenwirken könnten, fand unsere Arbeitsgruppe in Ribonuklease (RNase) ein Enzym mit potenzieller

therapeutischer Relevanz. Präklinische Studien zeigten eine antithrombotische Funktion von RNase in einem Thrombosemodell an Mäusen (Kannemeier et al., 2007), Verhinderung von Ödembildung und Gefäßverschluss im *Sinus sagittalis superior* bei einem Schlaganfallmodell von Ratten (Gerriets et al., 2004, ; Rottger et al., 2005) und kardioprotektive Eigenschaften bei Ischämie/Reperfusionsschäden am Herzen von Mäusen (Cabrera-Fuentes et al., 2014).

Humane Endothelzellen exprimieren selektiv RNase 1 (Landre et al., 2002; Fischer et al., 2011). Das eRNA/RNase 1-System bietet somit einen neuen Bereich zur Erforschung der Regulierung der Gefäßhämostase.

Die Wirkung von RNase könnte auf der Lösung und damit Inaktivierung von Komplexen, die von extrazellulärer RNA ausgehen, beruhen. Da es Parallelen in der Pathophysiologie der Transplantatdysfunktion mit den Auswirkungen von eRNA gibt, basierend auf postoperativen Ischämie/Reperfusionsschäden, Abstoßungsreaktionen, intravasalen thrombotischen Veränderungen und zuletzt Malperfusion des Transplantats, halten wir eine Untersuchung der protektiven Eigenschaften von RNase im Bereich der Herztransplantation für sinnvoll, um neue Substanzen zur Verbesserung des Transplantatüberlebens zu finden. Es soll untersucht werden, ob die Behandlung mit RNase im Transplantationsmodell einen Einfluss auf das Transplantatüberleben zeigt, indem Leukozytenadhäsion und -transmigration reduziert, sowie Ödem- und Thrombusbildung verringert werden können (Abbildung 1).

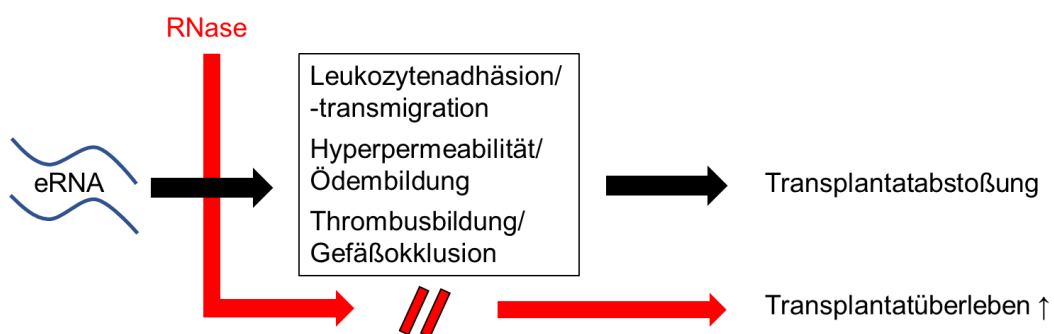


Abbildung 1. Wirkmechanismen von extrazellulärer RNA (eRNA) und Ansatzpunkt von RNase A im Transplantationsmodell (eigene Darstellung)

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Geschichte der Herztransplantation

Die Herztransplantation gilt als die standardmäßige Behandlungsoption der terminalen Herzinsuffizienz (Schneidt et al., 2000; Schmid et al., 2004). Die Geschichte der Herztransplantation hat ihren Beginn im zwanzigsten Jahrhundert. Im Jahr 1905 verpflanzten Guthrie und Carrel heterotop das erste Hundeherz zur Studie ihrer Gefäßnähte (Carrel et al., 1905). Histologische Befunde wurden erstmals 1933 von Mann et al. in ihrer Versuchsreihe beschrieben. Verschiedene Arbeitsgruppen führten weitere heterotope Herztransplantationen an Hunden durch, wobei eine maximale Überlebenszeit der Versuchstiere von 32 Tagen erreicht wurde (Marcus et al., 1951; Downie et al., 1953; Demikhov et al., 1962).

Nach Einführung der Herz-Lungen-Maschine durch Gibbon (1954) wurde erstmals die orthotope Herztransplantation im Tierversuch durchgeführt. Dabei wurden unter anderem zusätzliche Erkenntnisse zur Myokardprotektion des Spenderherzens gewonnen (Goldberg et al., 1958; Cass et al., 1959; Webb et al. 1959). Die erste erfolgreiche orthotope Herztransplantation mit völliger Rekonvaleszenz des Versuchstieres wurde 1960 von Lower und Shumway publiziert. Die Überlebenszeit von 5 Hunden lag zwischen 6 und 21 Tagen.

Die erste Xenotransplantation wurde 1964 von Hardy et al. durchgeführt. Er implantierte in Ermangelung eines allogenen Spenderherzens einem 68-jährigen Patienten ein Schimpansen-Transplantat, welches den Kreislauf allerdings nicht aufrechterhalten konnte. Eine Stunde nach Reperfusion des Schimpansen-Transplantates verstarb der Patient durch eine akute Abstoßungsreaktion.

Man erreichte in allen Versuchen dieser Zeit eine kontinuierliche Verbesserung der chirurgischen Techniken, doch durch die Einführung eines immunsuppressiven Therapeutikums mit 6-Mercaptopurin beziehungsweise Azathioprin und Methylprednisolon gelang Lower und Shumway 1965 zusammen mit Dong schließlich der Durchbruch. Versuchstiere überlebten mit dieser Behandlung bis zu 250 Tage (Lower und Shumway, 1965).

Am Groote Schuur Hospital in Kapstadt (Südafrika) implantierte Barnard am 2. Dezember 1967 dem 54-jährigen Louis Washkansky zum ersten Mal das Herz einer

verstorbenen 24-jährigen Spenderin (Barnard, 1967). In den darauffolgenden Jahren wurden vermehrt Herztransplantationen durchgeführt. Dennoch betrug die mittlere Überlebenszeit bei humanen Herztransplantationen nur 29 Tage, was einen Rückgang der Transplantationsaktivitäten über circa ein Jahrzehnt zur Folge hatte. Limitierend waren die Abstoßung des Transplantats, Infektionen und fehlende Diagnosemöglichkeiten zur Abstoßungsbestimmung (Cooley et al., 1969; Zenker et al., 1969).

Die durch Caves entwickelte transvenöse Endomyokardbiopsie, die histologische Einteilung zur Diagnostik von Abstoßungsreaktionen von Billingham 1973/74 und die Einführung von Cyclosporin A im Jahre 1981 führten zum endgültigen Erfolg (Billingham, 1973; Borel et al., 1976; Caves et al., 1973; Oyer et al., 1982).

Die Herztransplantation ist heutzutage weiterhin die Therapie der Wahl bei fortschreitendem Herzversagen. Die Einführung von neuen Immunsuppressiva, frühzeitige Erkennung von Abstoßungsvorgängen und neue Erkenntnisse in der Auswahl und Kombination von Spender und Empfänger eines Transplantats haben dazu geführt, dass das Transplantatüberleben verbessert werden konnte.

Durch die Entdeckung von Tacrolimus im Jahr 1987 durch Kino et al. und die klinische Einführung im Jahre 1994 als immunsuppressives Therapeutikum wurde ein neuer Meilenstein in der Transplantationsmedizin geschaffen. Der Calcineurininhibitor Tacrolimus unterdrückt die Interleukin-2-Produktion, welche mit der Aktivierung von T-Lymphozyten in Verbindung steht, somit wird die Differenzierung und Proliferation von zytotoxischen T-Lymphozyten inhibiert (Yokota et al., 1989). Calcineurininhibitoren gehören heute zur standardmäßigen Immuntherapie in Verbindung mit Antimetaboliten wie *mycophenolate mofetil* (Jabbour und Macdonald, 2015).

Die Endomyokardbiopsie gilt weiterhin als der Goldstandard zur frühzeitigen Erkennung von Transplantatabstoßungen. Dadurch können Abstoßungen bereits vor der Entwicklung von klinischen Symptomen des Patienten diagnostiziert werden. In einer Studie von Kobashiwawa et al. (2015) wurden diese Endomyokardbiopsien mit Genexpressionsprofilen verglichen. Über einen Zeitraum von 18 Monaten nach Herztransplantation zeigte sich kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen im Hinblick auf Retransplantation, Transplantatabstoßung, Transplantatdysfunktion und in der Zunahme der Intima von Koronargefäßen. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie

stellen Untersuchungen mittels Genexpressionsprofilen als eine *noninvasive* Methode zur Früherkennung von Transplantatabstoßungen dar.

Roig et al. (2015) zeigten in Ihrer Studie, dass transplantierte Herzen von Spendern im Alter von ≥ 50 Jahren, im Vergleich zu jüngeren Spenderherzen, bei Empfängern zu einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen führten. Hinsichtlich der akuten Abstoßung konnten sie keine Unterschiede aufweisen.

Laut einer Studie von Eifert et al. (2012) lag die durchschnittliche Überlebenszeit von Herztransplantaten bis 2012 bei 10 Jahren unter lebenslanger immunsuppressiver Therapie (Behandlungsrichtlinien der ISHLT siehe Abschnitt II. 3). Das Durchschnittsalter von herztransplantierten Männern lag bei 48 Jahren und das von Frauen bei 43 Jahren. Das längste Transplantatüberleben wurde erzielt, wenn sowohl Spender als auch Empfänger weiblich waren und eher schlechtere Ergebnisse wurden erzielt, wenn männlichen Empfängern ein weibliches Spenderherz implantiert wurde (Eifert et al., 2012).

Im Jahr 2016 wurden laut der Deutschen Stiftung für Organtransplantationen (DSO) in Deutschland 297 Herztransplantationen in 22 Kliniken durchgeführt und 450 Patienten neu zur Transplantation angemeldet (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2016)

2. Transplantatabstoßung

Die Transplantatabstoßung ist die Summe der immunologischen Prozesse, welche zur Schädigung des Transplantates führen. Klinisch werden je nach Zeitpunkt des Auftretens, der Progressivität und der spezifischen Art des Schadens unterschieden:

- Hyperakute oder akzelerierte Abstoßung
- Akute Abstoßung
- Chronische Transplantatdysfunktion.

2.1. Hyperakute oder akzelerierte Transplantatabstoßung

Bei vorab sensibilisierten Empfängern kann es zu einer hyperakuten oder akzelerierten Abstoßung des Transplantats kommen. Die Sensibilisierung des Empfängers führt zu einer durch B- und T-Lymphozyten vermittelten Immunreaktion, bei der präformierte Antikörper des Transplantatempfängers an endotheliale Antigene des Spenders binden. Daher folgt der hyperakuten Abstoßung innerhalb von Minuten (z.B. bei Xenotransplantationen) oder der akzelerierten Abstoßung nach Stunden (z.B. durch bereits bestehende Sensibilisierung durch Bluttransfusion oder Gravidität) die Organdysfunktion. Dabei stehen Hämorrhagien und thrombotische Verschlüsse der Anastomosen klinisch im Vordergrund (Platt, 1991; Platt und Bach, 1991; Chapman, 1986; Jordan, 1988).

2.2. Akute Transplantatabstoßung

Die akute Abstoßung tritt ohne immunsuppressive Therapie klassischerweise nach fünf bis sieben Tagen auf. Klinisch stehen hier die Symptome des Organversagens im Vordergrund. In der kardiologischen Transplantationsmedizin bedeutet dies das Auftreten von Zeichen des progredienten Herzversagens, wie z.B. die Dyspnoe durch Bildung eines Lungenödems. Zur Abstoßungseinteilung und Diagnosesicherung werden Myokardbiopsien genommen. In der histologischen Untersuchung dieser Biopsate zeigt sich hauptsächlich eine progrediente, zelluläre Infiltration, die primär aus T-Lymphozyten, aber auch anderen Leukozyten besteht. Diese Zellen schädigen das Parenchym und Endothelzellen, was zu einer verminderten Perfusion bis hin zu Infarkten des Transplantatgewebes führt (Azuma et al., 1996; Billingham et al., 1985;

Sibley, 1986).

2.3. Chronische Transplantatdysfunktion

Die chronische Transplantatdysfunktion zeigt sich klassischerweise erst im Langzeitverlauf nach einer Herztransplantation. Sie ist histologisch vor allem durch eine langsam voranschreitende konzentrische neointimale Proliferation der Gefäßwände, die zum Verschluss der Koronargefäße führt, gekennzeichnet. Diesen Prozess bezeichnet man als Transplantatvaskulopathie. Des Weiteren kommt es im Transplantat zur Ausbildung einer parenchymalen Atrophie und einer interstitiellen Fibrose.

Man nimmt an, dass nach dem *Response-to-injury*-Modell der chronischen Abstoßung die Proliferationen von Endothelzellen ihre Ursache in vorangegangenen Mikroläsionen haben (Weis und Von Scheidt, 1997). Es gibt Hinweise, dass diese initialen Schäden in Perioden der akuten Abstoßung entstehen können. Diese akuten Abstoßungsperioden werden in einigen Studien in ihrer Anzahl und Schweregrad mit dem Erscheinen der TVP in Verbindung gebracht (Uretsky et al., 1987; Kobashigawa et al., 1995; Fellstrom et al., 1999).

3. Behandlungsrichtlinien der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation (ISHLT)

Im Jahre 2010 wurde von Costanzo et al. durch die Internationale Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation (ISHLT) eine Richtlinie zur Behandlung der verschiedenen Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation veröffentlicht, welche im Folgenden in zusammengefasster Form wiedergegeben ist:

3.1. Klassischer Therapieansatz

Als Mittel der Wahl zur immunsuppressiven Therapie wird bei Herztransplantationen ein Calcineurin-Inhibitor (meist Tacrolimus) verwendet. Zur Vorbeugung einer TVP werden zudem Mycophenolat mofetil (MMF), als auch mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-Inhibitoren (z.B. Sirolimus oder sein Derivat Everolimus) empfohlen. Zusätzlich werden als dritte Komponente der Therapie (teilweise nur in den ersten Monaten nach Herztransplantation) Kortikosteroide verwendet. Bei pädiatrischen Patienten und Patienten mit erhöhtem Risiko für renale Dysfunktion kann eine Induktionstherapie mit polyklonalen Antikörpern verwendet werden, um anfangs die nierentoxischen Calcineurin-Inhibitoren zu sparen (Costanzo et al., 2010).

3.2. Langzeit-Therapieansatz

Kortikosteroide können bei Patienten, bei denen kein Verdacht auf Abstoßung vorliegt oder jenen, die keine Anti-Humanes-Leukozyten-Antigen (HLA)-Antikörper vorweisen, nach circa drei bis sechs Monaten ausgeschlichen und abgesetzt werden. Die Langzeittherapie besteht dann aus lebenslanger Fortführung einer immunsuppressiven Zweifach-Therapie (z.B. Tacrolimus und MMF oder Everolimus und Cyclosporin A) mit patientenbezogener Dosisangleichung, um eine chronische Abstoßung zu vermeiden (Costanzo et al., 2010).

3.3. Therapieansatz bei hyperakuter Abstoßung

Bei einer hyperakuten humoralen Abstoßung ist eine sofortige Behandlung mit intravenöser Medikamentenapplikation indiziert. Es werden hochdosierte Kortikosteroide, Immunglobuline, Calcineurininhibitoren, Mycophenolat Mofetil,

inotrope und vasopressorische Medikamente eingesetzt. Zudem kommen auch Plasmapherese und eine zytolytische immunsuppressive Therapie zum Einsatz (Costanzo et al., 2010).

3.4. Therapieansatz bei akuter Abstoßung

Eine sofortige Therapie sollte bei der akuten zellulären Abstoßung begonnen werden, wenn klinische Symptome vorliegen, allerdings auch wenn der Patient noch symptomfrei ist, aber die zelluläre Abstoßung histologisch mittels Biopsie diagnostiziert wurde. Als erster Schritt wird die bestehende Immunsuppression in der Dosis erhöht und mit einer Stoßtherapie von Kortikosteroiden begonnen.

Bei symptomfreien Patienten mit mittelgradigem Abstoßungsgrad können Kortikosteroide peroral verabreicht werden, während die intravenöse Gabe von hochdosierten Kortikosteroiden bei Patienten mit Symptomen bereits bei einem geringgradigen Abstoßungsgrad indiziert ist. Zusätzlich werden je nach Schweregrad auch weitere Maßnahmen wie anti-thymozytische Antikörper und bei hämodynamischen Einschränkungen Vasopressoren und inotrope Medikamente empfohlen.

Bei rezidivierender kortikosteroidresistenter akuter zellulärer Abstoßung muss die bisherige Therapie reevaluiert werden, zusätzlich können Methotrexat, Photophorese und eine totallymphatische Bestrahlung in Betracht gezogen werden (Costanzo et al., 2010).

3.5. Therapieansatz bei chronischer Abstoßung

Zum Ausschluss einer chronischen Abstoßung sollte auch noch Jahre nach der Transplantation bei pathologischen Vorbefunden im sechs- bis zwölfmonatigen Abstand eine Koronarangiographie durchgeführt werden. Präventiv sollten Prädispositionen, wie z.B. Hypertension, Hyperlipidämie, Rauchen, Alkoholkonsum oder Übergewicht vermieden werden. Die Therapie mit Statinen zeigte präventive Erfolge.

Sowohl MMF als auch die mTOR-Inhibitoren haben in zahlreichen Studien einen therapeutischen Vorteil bezüglich der Entstehung einer TVP gezeigt. Bei Anzeichen einer Transplantatvaskulopathie kann daher auf die Kombinationstherapie von MMF und mTOR-Inhibitoren umgestellt werden (Guethoff et al., 2013).

Bei sehr schweren Fällen der Transplantatdysfunktion in Folge einer TVP, wird wenn möglich eine Revaskularisation und wenn nötig eine Retransplantation empfohlen (Costanzo et al., 2010).

4. Ribonukleinsäure (RNA)

Die Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA) ist ein im Aufbau der Desoxyribonukleinsäure (engl. *dexoxyribunucleic acid*, DNA) ähnliches Molekül. Sie besteht aus den Nukleotiden Cytosin, Guanin, Adenin und Uracil, welche über Zuckermoleküle und Phosphorsäurediester miteinander verbunden sind.

4.1. Extrazelluläre RNA

Im Rahmen von Gewebeschäden und Nekrosen werden intrazelluläre Bestandteile wie auch Nukleinsäuren in die Umgebung der Läsion und das Blutplasma freigesetzt. Diese freigesetzte RNA wird als extrazelluläre RNA (eRNA) bezeichnet (Fischer et al., 2013). Bereits 1985 postulierte Wieczorek, dass bei Patienten mit malignen Tumoren, bei denen es ebenfalls zu Zellschäden und Nekrosen kommt, im Plasma befindliche RNA-Lipidkomplexe als diagnostische Marker fungieren können (Wieczorek et al., 1985). Extrazelluläre RNA wurde auch als Promotor für die Blutgerinnung beschrieben, indem sie das Kontaktphasesystem aktiviert (Kannemeier et al.; 2007). Dieses wiederum kann das Komplementsystem aktivieren (Ghebrehiwet et al., 1983), wodurch eine Gerinnungskaskade in Gang gesetzt wird. In unserer Arbeitsgruppe konnte für extrazelluläre RNA eine Induktion der Leukozytenadhäsion und -transmigration aus den Gefäßen in das Gewebe in einem *In-vivo*-Mausmodell am *Musculus cremaster* (Fischer et al., 2012) und zudem eine Steigerung der Gefäßpermeabilität und Ödembildung durch eRNA nachgewiesen werden (Fischer et al., 2007) (Abbildung 2).

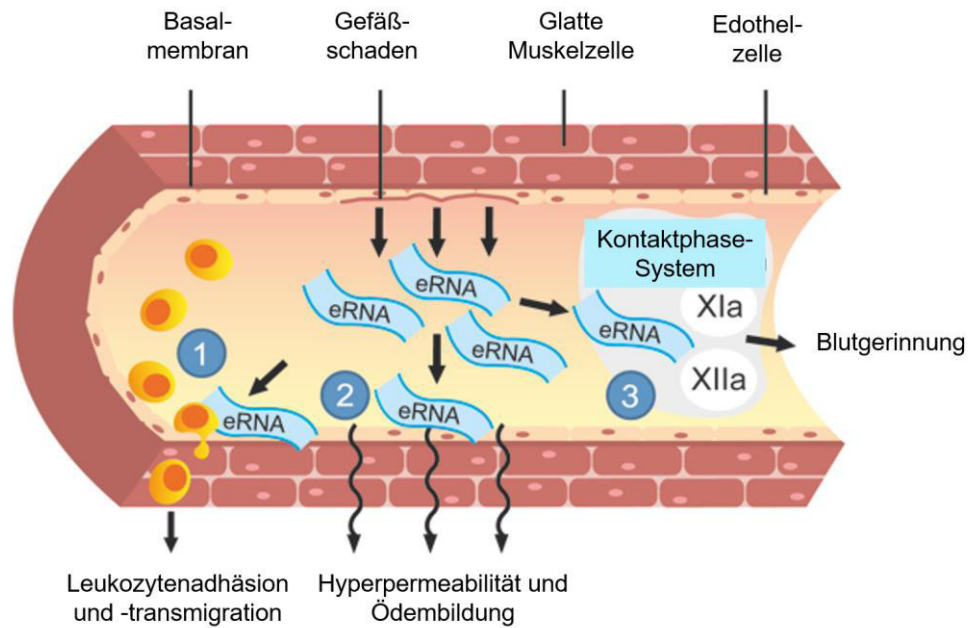


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Auswirkungen von extrazellulärer RNA. Gefäßschädigung und Zelluntergang führen zu Freisetzung von intrazellulären Komponenten wie extrazellulärer RNA (eRNA) in das Gefäßlumen und umliegendes Gewebe. Extrazelluläre RNA führt zu: 1) Leukozytenadhäsion und -transmigration über proinflammatorische Zytokine, 2) Ödembildung indem die Gefäßpermeabilität erhöht wird und 3) wirkt als prokoagulatorischer Kofaktor bei der Aktivierung des Kontaktphasesystems. Dies führt so zu vermehrter Thrombusbildung und Gefäßokklusion. Alle diese Mechanismen werden auch in Verbindung mit akuter Abstoßung nach Herztransplantation gebracht (Kleinert. et al., 2016).

5. Ribonuklease

Ribonukleasen (RNasen), sind Enzyme der Klasse Nuklease. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung von Phosphodiesterbindungen in Ribonukleinsäure-Ketten und gewährleisten so den Abbau von RNA-Molekülen.

5.1. Bovine Ribonuklease A

Bovine Ribonuklease A (RNase A) ist eine pankreatische RNase. Sie besteht aus 124 Aminosäuren und zeigt eine sehr hohe Effizienz RNA hydrolytisch zu spalten (Schein, 1997). Ribonuklease A ist eines der ersten Biomoleküle, dessen Struktur aufgeklärt wurde, und dies bereits im Jahre 1967 (Kartha et al., 1967). Eine auffallende Eigenschaft der RNase A ist die hohe Hitzestabilität über 100° Celsius ohne zu denaturieren (Dubos et al., 1937). Es gehört zu den am besten erforschten Enzymen. RNase A wurde zuerst 1939/1940 isoliert und kristallisiert (Kunitz, 1939; Kunitz 1940) und seit 1960 sequenziert und synthetisiert (Smyth et al., 1963; Gutte et al., 1969).

In einem murinen Thrombosemodell zeigte RNase eine antithrombotische Funktion (Kannemeier et al., 2007). Zudem konnte Ribonuklease die Bildung von Ödem- und Gefäßokklusion im *Sinus sagittalis superior* in einem Schlaganfallmodell an Ratten vorbeugen (Gerriets et al., 2004; Rottger et al., 2005) und zeigte kardioprotektive Eigenschaften bei Ischämie/Reperfusionsschäden am Herzen von Mäusen (Cabrera-Fuentes et al., 2014).

5.2. Humane Ribonuklease 1

Die humane RNase 1 ist das Äquivalent der bovinen RNase A. Dieses Enzym besteht aus 128 Aminosäuren, dies sind 4 Aminosäuren mehr als bei RNase A (Beintema et al., 1984) und zeigt identische hydrolytische RNase-Aktivität (Weickmann et al., 1981). Es ist beschrieben, dass humane Endothelzellen selektiv RNase 1 exprimieren (Landre et al., 2002; Fischer et al., 2011).

III. EXPERIMENTELLES DESIGN UND ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Untersuchung soll der Einfluss von RNase A auf das Transplantatüberleben in einem experimentellen Herztransplantationsmodell an Ratten untersucht werden.

Brown-Norway-Rattenherzen wurden nach Durchspülung mit kardiopleger Lösung explantiert, gewogen, auf Eis gelagert und heterotop in das Abdomen von Lewis-Ratten implantiert. Hierbei wurden alle Gefäße bis auf die *Aorta ascendens* und der *Truncus pulmonalis* des Transplantats ligiert und anschließend die *Aorta ascendens* des Transplantats mit der *Aorta abdominalis* des Empfängertieres kaudal der Nierengefäße mittels End-zu-Seit-Anastomose verbunden und der *Truncus pulmonalis* des Transplantats mit der *Vena cava caudalis* des Empfängers auf gleiche Weise verbunden (Abbildung 3).

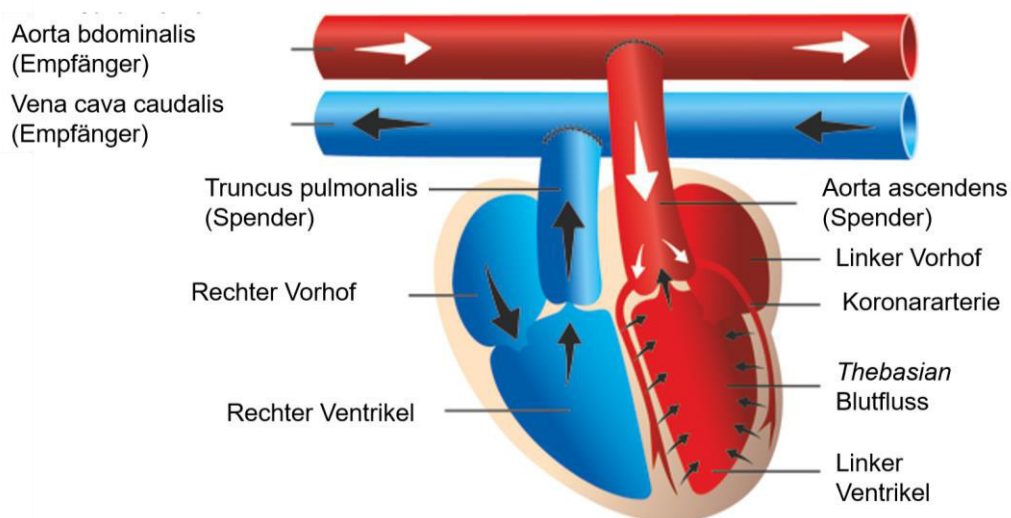


Abbildung 3. Methode der heterotop abdominalen Herztransplantation
Schematische Darstellung der heterotop abdominalen Transplantationsmethode mit End-zu-Seit-Anastomosen der Empfängeraorta mit der *Aorta ascendens* des Spenders und der *Vena cava caudalis* des Empfängers mit dem *Truncus pulmonalis* des Spenders. Das Transplantat wird über die Koronararterien perfundiert, über die Koronarvenen gelangt das Blut in das rechte Herz und über den *Truncus pulmonalis* zurück in die *Vena cava caudalis* des Empfängers (Kleinert et al., 2016).

Prä Transplantation wurden die Ratten nach zufälligem Losverfahren in 2 Gruppen unterteilt. Die Empfängertiere der Kontrollgruppe wurden mit Kochsalzlösung alleine

und jene der RNase A-Gruppe mit RNase A (50µg/kg) jeweils 30 Minuten vor Transplantation und danach jeden zweiten Tag intravenös behandelt. Das Transplantatüberleben wurde zweimal täglich mittels transabdominaler Palpation evaluiert und bei ungewissem Palpationsbefund mittels Echokardiographie überprüft. An Tag 2 und 4 nach Transplantation und bei Transplantatabstoßung wurden immer echokardiographische Untersuchungen zur Beurteilung der Thrombusbildung in den Herzkammern angefertigt. Die Empfängertiere wurden bei Transplantatversagen und in 2 weiteren Gruppen an Tag 1 und Tag 4 nach Transplantation erlöst, Blutproben zur Bestimmung der Troponin I Spiegel gesammelt und die Herzen explantiert. Nach Explantation wurden die Herzen gewogen und in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Jede zweite Scheibe wurde für histologische und quantitativ stereologische Untersuchungen in 4%-Formalynlösung über Nacht fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, welche dann auf Objektträger für Hämatoxilin-Eosin sowie immunhistochemische Färbungen übertragen wurden. Die verbliebenen Scheiben wurden für FACS-Analysen enzymatisch verdaut und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD45 und Ly6G inkubiert, fixiert, gewaschen und ausgewertet (Abbildung 4).

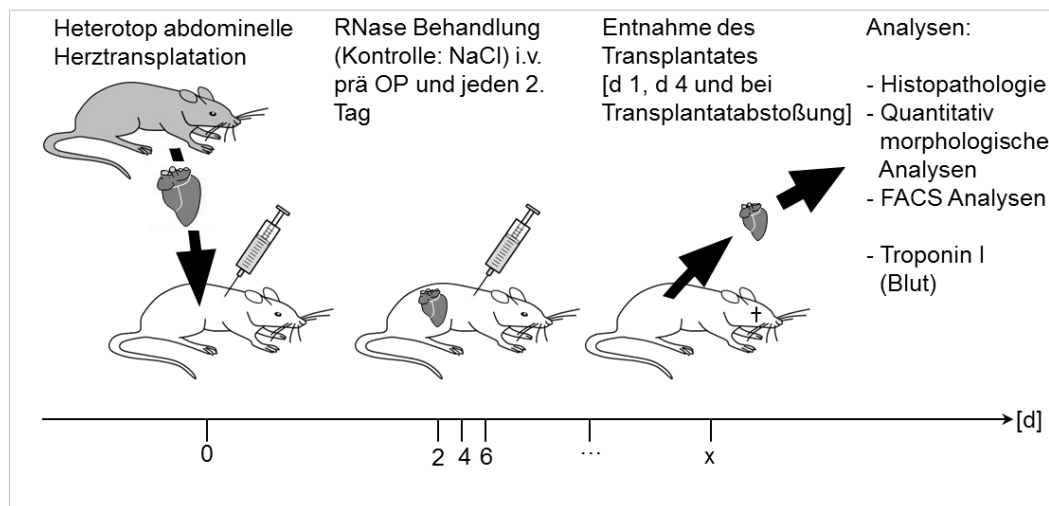


Abbildung 4. Zeitlichen Abfolge (d=Tage) nach Herztransplantation

Die Empfängertiere wurden vor Implantation und darauf jeden 2. Tag mit RNase A (50 µg/kg i.v.) oder als Kontrolle mit Kochsalzlösung alleine behandelt. An definierten Zeitpunkten (Tag 1 und 4 nach Transplantation) und bei Transplantatabstoßung (x) wurden die Herzen explantiert und für quantitativ-stereologische Untersuchungen und FACS-Analysen aufbereitet und Blutproben zur Bestimmung der Troponin I Spiegel gewonnen (Darstellung von PD Dr. Andreas Parzefall).

Zusätzlich zur Kontroll- und RNase-Gruppe wurden noch 2 weitere Gruppen untersucht. Diese Ratten wurden mit aktiver rekombinanter humanen RNase 1 oder in einer weiteren Gruppe mit inaktiver rekombinanter humanen RNase 1 (jeweils 50µg/kg prä OP und jeden 2. Tag i.v.) behandelt und das Transplantatüberleben in gleicher Weise, wie oben beschrieben, evaluiert.

In der Transplantationsmedizin sind Abstoßungsreaktionen von zentraler Bedeutung (Lund et al., 2014). In dem vorliegenden Forschungsprojekt sollte an den heterotop transplantierten Ratten die intravenöse Injektion von RNase A als potenzielle Substanz zur Prävention bzw. Verzögerung von Abstoßungsreaktionen getestet werden. Da für die komplexen Immunreaktionen ein intakter Gesamtorganismus notwendig ist, steht keine geeignete *In-vitro*-Methode als Alternative zum Tierversuch zur Verfügung. Im Rahmen eines Allotransplantationsmodells soll der bereits in der Literatur gezeigte Einfluss von RNase A auf die Leukozytenadhäsion und -transmigration untersucht werden, sowie die protektive Wirkung von RNase A bezüglich Thrombosen bzw. Gefäßokklusion und Ödembildung, wie sie im Zusammenhang mit Abstoßungsreaktionen ablaufen, evaluiert werden. Um eine Aussage über den Wirkungsmechanismus der RNase in diesem Gebiet treffen zu können, wurden zudem eine rekombinante aktive und inaktive humane RNase getestet.

Als primäres Versuchsziel wurde eine Verbesserung des Transplantatüberlebens durch die Therapie mit RNase A angestrebt.

Zudem wurden zur Untersuchung des Einflusses von RNase auf die transplantierten Herzen folgende Studienparameter untersucht:

- Histopathologische Untersuchung aller Organe der Versuchstiere 3 Wochen nach Behandlung mit RNase im Vergleich zu Kontrolltieren um mögliche Nebenwirkungen der Studienmedikation zu beurteilen (in Anlehnung an Registry of Industrial Toxicology Animal-data; Ruehl-Fehlert et al., 2003; Kittel et al., 2004; Morawietz et al., 2004)
- Quantitativ-stereologische Analysen von Herzmuskelproben, welche an Tag 1 und 4 nach Transplantation explantiert wurden, hinsichtlich der Volumendichten (angegeben in Prozent) von Myokard im Herz ($V_V(\text{Myokard/Herz})$), Ödem im Myokard ($V_V(\text{Ödem/Myokard})$) und Makrophagen, T- und B-Lymphozyten im Myokard ($V_V(\text{CD68+/Myokard})$, $V_V(\text{CD3+/Myokard})$ und $V_V(\text{CD20+/Myokard})$). Die absoluten Volumina (angegeben in mm^3) der jeweiligen

Herzen, des Myokards, des Ödems, und von Makrophagen, T- und B-Lymphozyten im Myokard wurden aus den Volumendichten berechnet ($V_{(\text{Herz})}$, $V_{(\text{Myokard, Herz})}$, $V_{(\text{Ödem, Myokard})}$, $V_{(\text{CD68}^+, \text{Myokard})}$, $V_{(\text{CD3}^+, \text{Myokard})}$ und $V_{(\text{CD20}^+, \text{Myokard})}$).

- Analysen mittels Durchflusszytometrie (FACS) von enzymatisch verdautem Herzmuskelgewebe von CD45^+ -Zellen (Leukozyten) und CD45^- - und Ly6G^+ -Zellen (neutrophile Granulozyten) pro Gesamtzellzahl (Angaben in Prozent) an Tag 1 und 4 nach Transplantation.
- Analysen der Serum Troponin I Spiegel im Blut am ersten und vierten postoperativem Tag
- Echokardiographische Vergleiche der ventrikulären Thrombusformation in den unterschiedlich behandelten Gruppen an Tag 2 und 4 nach Transplantation und bei Transplantatabstoßung.
- Analyse des Einflusses von RNase A auf die T-Zellproliferation in der gemischten Lymphozytenreaktion (*In-vitro*-Methode)

In der vorliegenden Studie wird zum ersten Mal RNase A im Vergleich zu einer humanen rekombinanten aktiven und inaktiven RNase bei herztransplantierten Tieren eingesetzt. Daher hat diese Studie einen explorativen Charakter, wodurch die Gruppengrößen klein gehalten werden und im Fall positiver Ergebnisse für weitere Forschungsvorhaben als Basis dienen können.

IV. PUBLIKATION

Ribonuclease (RNase) Prolongs Survival of Grafts in Experimental Heart Transplantation

Eike Kleinert, DVM; Martin C. Langenmayer, DVM; Bruno Reichart, MD; Jana Kindermann, DVM; Barbara Griemert, PhD; Andreas Blutke, DVM; Kerstin Troidl, PhD; Tanja Mayr, DVM; Tobias Grantzow, MD; Fatih Noyan, PhD; Jan-Michael Abicht, MD; Silvia Fischer, PhD; Klaus T. Preissner, PhD; Ruediger Wanke, DVM; Elisabeth Deindl, PhD;* Sonja Guethoff, MD*

Background—Cell damage, tissue and vascular injury are associated with the exposure and release of intracellular components such as RNA, which promote inflammatory reactions and thrombosis. Based on the counteracting anti-inflammatory and cardioprotective functions of ribonuclease A (RNase A) in this context, its role in an experimental model of heart transplantation in rats was studied.

Methods and Results—Inbred BN/OrlRj rat cardiac allografts were heterotopically transplanted into inbred LEW/OrlRj rats. Recipients were intravenously treated every other day with saline or bovine pancreatic RNase A (50 µg/kg). Toxic side effects were not found (macroscopically and histologically). Heart tissue flow cytometry and quantitative morphological analyses of explanted hearts at postoperative day 1 or postoperative day 4 showed reduced leukocyte infiltration, edema, and thrombus formation in RNase A-treated rats. In allogeneic mixed lymphocyte reactions, RNase A decreased the proliferation of effector T cells. RNase A treatment of rats resulted in prolonged median graft survival up to 10.5 days (interquartile range 1.8) compared to 6.5 days (interquartile range 1.0) in saline treatment ($P=0.001$). Treatment of rats with a new generated (recombinant) human pancreatic RNase 1 prolonged median graft survival similarly, unlike treatment with (recombinant) inactive human RNase 1 (each 50 µg/kg IV every other day, 11.0 days, interquartile range 0.3, versus 8.0 days, interquartile range 0.5, $P=0.007$).

Conclusions—Upon heart transplantation, RNase administration appears to present a promising and safe drug to counteract ischemia/reperfusion injury and graft rejection. Furthermore, RNase treatment may be considered in situations of critical reperfusion after percutaneous coronary interventions or in cardiac surgery using the heart–lung machine. (*J Am Heart Assoc.* 2016;5:e003429 doi: 10.1161/JAHA.116.003429)

Key Words: edema • extracellular RNA • ischemia/reperfusion injury • ribonuclease • transplantation

Following heart transplantation, acute graft rejection is often accompanied by edema, hemorrhage and vasculitis, polymorphic inflammatory leukocyte infiltration, as well as the damage and necrosis of cardiomyocytes.^{1,2} Tissue injury leads to the release of intracellular components such as ribonucleic acids (RNA), now referred to as extracellular RNA (eRNA).³ The appearance of eRNA in connection with cardiovascular diseases and inflammation has recently been demonstrated to involve (1)

leukocyte recruitment by eRNA-induced proinflammatory cytokines,⁴ (2) eRNA-promoted vascular permeability and edema formation,⁵ as well as (3) thrombus formation and vessel occlusion due to eRNA-mediated activation of the contact phase of intrinsic blood coagulation⁶ (Figure 1). All these mechanism may contribute to the damaging nature of eRNA in pathophysiological situations of atherosclerosis or cardiac ischemia/reperfusion (I/R) injury, as shown by our recent work.^{7,8}

From the Walter Brendel Centre of Experimental Medicine (E.K., B.R., J.K., T.M., T.G., J.-M.A., E.D., S.G.), Institute of Veterinary Pathology at the Centre for Clinical Veterinary Medicine (M.C.L., A.B., R.W.), Institute for Infectious Diseases and Zoonoses (M.C.L.), and Departments of Cardiac Surgery (J.K., S.G.) and Anaesthesiology (T.M., J.-M.A.), Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany; Institute of Biochemistry, Medical School, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany (B.G., S.F., K.T.P.); Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany (K.T.); Department of Vascular and Endovascular Surgery, University Hospital Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany (K.T.); Department of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology, Hannover Medical School, Hannover, Germany (F.N.).

*Dr Deindl and Dr Guethoff contributed equally to this work.

Parts of this study were presented at the American Society of Transplantation (AST) Cutting Edge of Transplantation meeting in Chandler, Arizona, February 5–7, 2015.

Correspondence to: Elisabeth Deindl, PhD, Walter Brendel Centre of Experimental Medicine, Marchioninstr. 27, 81377 München, Germany. E-mail: elisabeth.deindl@med.uni-muenchen.de

Received February 20, 2016; accepted March 3, 2016.

© 2016 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley Blackwell. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

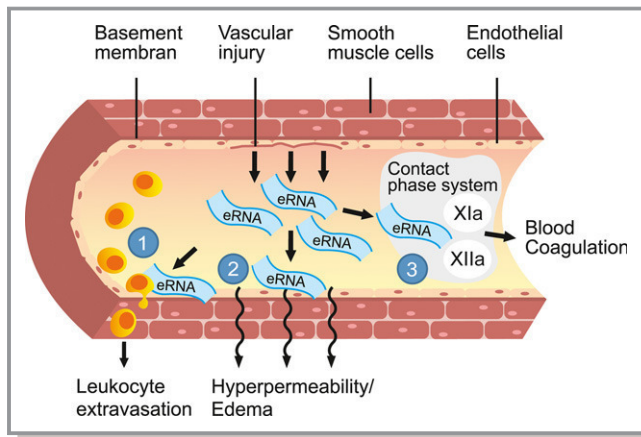


Figure 1. Multiple functions of extracellular ribonucleic acids (eRNA). Vascular injury leads to release of intracellular components such as RNA, referred to as eRNA.³ Extracellular RNA (1) promotes leukocyte recruitment as it mobilizes proinflammatory cytokines, (2) causes edema as it increases the permeability of blood vessels, and (3) serves as procoagulant cofactor by activating the contact phase system of intrinsic blood coagulation resulting in enhanced thrombus formation and vessel occlusion. All these mechanisms are supposed to be related to acute rejection reaction after organ transplantation. Illustration by Nina Bantschow.

The thermostable bovine pancreatic ribonuclease A (further called RNase A, 124 amino acids) is highly efficient in cleaving and destroying RNA.⁹ The well-studied enzyme was first isolated and crystallized in the 1930/1940s,^{10–12} and sequenced and synthesized since the 1960s.^{13,14} The human equivalent (human pancreatic ribonuclease, further called RNase 1, 128 amino acids) is distinguishable from bovine RNase A in its amino acid sequence,¹⁵ but is identical in its specific RNase cleaving activity.¹⁶

Human endothelial cells selectively express RNase 1; thus, the eRNA/RNase 1 system provides a new level of regulation of vascular homeostasis,^{17,18} exemplified by the vessel-protective functions of RNase administration in the following preclinical disease models: (1) antithrombotic function in arterial thrombosis in mice⁶; (2) prevention of edema and vascular occlusion in the superior sagittal sinus in a stroke model in rats^{5,19,20}; and (3) cardioprotection in myocardial I/R injury in mice and in the isolated I/R Langendorff-perfused rat heart.⁸

Based on these assumptions, it appears plausible to test the influence of RNase administration under conditions of acute organ rejection following heart transplantation.

Materials and Methods

Animals

For heart transplantation, BN/OrlRj rats served as donors and LEW/OrlRj rats as recipients (both from Janvier Labs, n=95 were included; exclusions due to technical failure). All animals

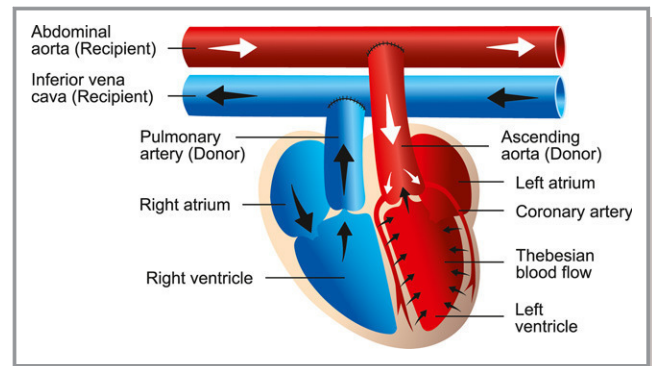


Figure 2. Method of heterotopic abdominal heart transplantation. The microsurgical technique consists of end-to-side anastomoses of the donor's aorta and the pulmonary artery trunk to the recipient's abdominal vessels, respectively. The heart is perfused via the coronary arteries. The coronary veins are joined together to form the coronary sinus, where the blood is delivered to the right atrium. The blood flow continues through the right ventricle and the pulmonary artery to the recipient's abdominal vena cava. Illustration by Nina Bantschow.

were inbred males with an age of 8 to 10 weeks (200–300 g) and housed in the animal care facility of the Walter Brendel Centre, Munich. The protocol was approved by the national animal welfare authority (Administration of Upper Bavaria) and the animals received humane care in accordance with the Directive 2010/63/EU.²¹

Heterotopic Abdominal Heart Transplantation

The anesthetized (intramuscular anesthesia: fentanyl 0.005 mg/kg, medetomidine 0.15 mg/kg, midazolam 2.0 mg/kg; subcutaneous antagonists: naloxone 0.12 mg/kg, atipamezole 0.75 mg/kg, flumazenil 0.2 mg/kg; additional isoflurane 2% O₂ via mask) donor rats (n=40) were systemically heparinized with 500 IE intravenously (IV). After perfusion with a cardioplegic solution (Crustadiol, Bretschneider, Köhler Chemie, Bensheim, Germany) the cardiac grafts were explanted, weighed, and transplanted into the abdomen of the anesthetized recipient rats (n=40) using common microvascular techniques for aorto-aortic and pulmonary artery to inferior vena cava anastomoses, respectively (Figure 2).²² Postoperative subcutaneous analgesia consisted of metamizole (200 mg/kg) and buprenorphine (0.05 mg/kg).

Study Medication and Treatment Groups

Three different RNases were used in the transplantation studies: (1) bovine pancreatic RNase A (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), (2) enzymatically active and (3) inactive recombinant human pancreatic RNase 1 (Fischer/Griemert/Preissner, Giessen, manufactured by ProteoGenix,

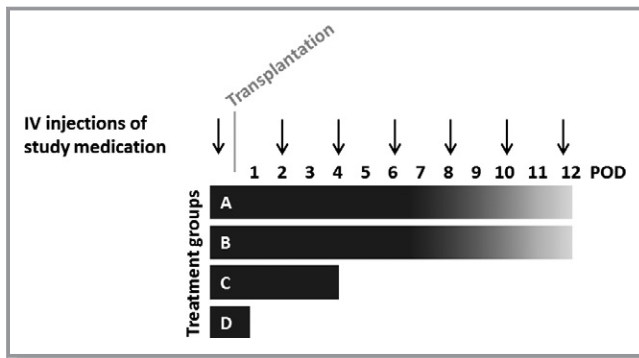


Figure 3. Study design and treatment groups. Study medications (RNase A, active and inactive RNase 1, and saline 0.9%) were intravenously injected 30 minutes before transplantations and then every other day. There were 4 different strategies: grafts of (A) RNase A or saline-treated animals (n=6 in each group), and (B) active and inactive RNase 1-treated animals (n=4 in each group) were examined daily and harvested at the time point of total graft dysfunction (verified by echocardiography); (C) 4 days (POD 4) and (D) 1 day (POD 1) after transplantation, the beating grafts of RNase A and saline-treated animals were harvested (n=5 in each group, FACS and histological analyses were performed). FACS indicates fluorescence-activated cell sorting; IV, intravenous; POD, postoperative day.

Schiltigheim, France). Following previous protocols,^{23,24} RNase dosages of 50 µg/kg (dissolved in 1 mL saline 0.9%) were given 30 minutes before transplantations and then every other day (Figure 3). Animals of the controls were treated with 1 mL saline 0.9%.

To evaluate the impact of RNase A on graft survival, six randomized allocated recipients were treated and sacrificed at the point of total graft rejection. In 2 additional treatment groups, the beating hearts were harvested either on the first postoperative day (POD 1, n=5) or on POD 4 (n=5), to investigate leukocyte infiltration in heart tissue (flow cytometry) and to analyze edema development and rejection reaction (histological analyses); at the early time point POD 1, our main focus was on the extent of I/R injury, whereas at POD 4 the ongoing cellular rejection was quantified. All RNase A-treated animals, and at the various time points, were compared with equal numbers of transplanted controls.

In order to prove that the ribonucleolytic activity of the RNase was responsible for the observed effects (inactive bovine RNase A is not available), active and inactive recombinant human RNase 1 were generated, studied, and compared (n=4 in each group).

Generation of Recombinant Ribonucleolytic Active and Inactive RNase 1

Total RNA was isolated from human cerebral microvascular endothelial cells (HCMEC-D3), kindly supplied by P.O. Couraud, Paris²⁵ to S. Fischer, B. Griemert, and K.T. Preissner, Giessen

using the purification kit from Sigma (Heidelberg, Germany) followed by cDNA synthesis using the high-capacity cDNA reverse transcription kit from Applied Biosystems (Darmstadt, Germany). To amplify the coding region of human RNase 1 by polymerase chain reaction (PCR), the following primers, containing specific restriction sites for *EcoRI* and *XhoI* (GenBank, accession no. NM_198232.2), were used: RNasepETfwd AGGAATTCATGGCTCTGGAGAAGTCTCTCTG and RNasepETrev ATCTCGAGTGGTAGAGTCCCTCCACAGAAGCATC and the Phusion High Fidelity DNA polymerase (Life Technologies, Darmstadt, Germany). Reaction tubes for PCR contained 10 mmol/L dNTPs, 10 mmol/L of each primer, 3% (v/v) dimethylsulfoxide, template, and 0.5 units of polymerase. Annealing temperature was 60°C and number of cycles was 30. The PCR product was purified using standard protocols (Qiagen, Venlo, Netherlands) and the GoTaq Green Kit (Promega, Mannheim, Germany) was used to produce polyA overhangs at the 3'-end. Ten microliters of purified PCR product were transferred into the same volume of 2xGoTaq Green Polymerase Mix and incubated for 30 minutes at 72°C. The PCR product was subcloned into the pDRIVE vector using the PCR cloning kit from Qiagen. The ligated plasmid with inserted RNase 1 sequence was amplified by transformation into competent DH5α cells. The plasmid was isolated using standard protocols (Qiagen). Inserted RNase 1 cDNA was excised and cloned into the pET32a vector (Novagen, Merck, Darmstadt, Germany), whereby both inserted RNase 1 cDNA and vector were pretreated with suitable restriction enzymes (*XhoI* and *EcoRI*; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The ligated plasmid with inserted RNase 1 sequence was transformed into competent DH5α cells. Plasmid DNA was purified using standard protocols (Qiagen) and analyzed by digestion with restriction enzymes followed by gel electrophoresis and by sequencing the product.

Site-directed mutagenesis was used to include point mutations in position 40, which will change CAT (histidin) to GTT (Valin). PCR was performed using 2 primers (each 10 mmol/L), complementary to each other, containing the mutant sequence (MutAkz1 CCAGCGGCAGCTTATGGACTCAGACAG and MutAkz2 CTGTCTGAGTCCATAACCTGCCGCTGG), dNTPs (10 mmol/L), 3% v/v dimethylsulfoxide, 250 ng of plasmid DNA (pET2a vector containing RNase 1 cDNA), 0.5 units of Phusion High Fidelity DNA polymerase (Life Technologies). Annealing temperature was 55°C for 10 minutes and PCR was performed with 20 cycles. PCR reaction was cooled down to room temperature and 10 units of DpnI was added and reaction mixture (20 µL) was incubated for 1 hour at 37°C. Five microliters of this PCR reaction tube was used for the transformation of competent JM109 cells. Plasmid DNA was purified (Qiagen, Hildesheim, Germany) and sequenced using pETfwd-primers.

RNase 1 wild-type (WT) and RNase 1 H40V cDNAs were used for cloning and for the expression of recombinant

proteins (manufactured by Proteogenix, Schiltigheim, France). Final samples of RNase 1 WT (human active) and RNase 1 H40V (human inactive) were quality controlled by SDS-PAGE. RNase activity was determined as described with minor modifications.^{18,26} Activity of mutated protein was reduced to 3.6% compared to the activity of WT protein.

Graft Examination

The primary end point of the study was the graft survival, which was assessed by daily examination of the graft function by palpation and transabdominal echocardiography under isoflurane. The graft function was graduated in good contraction (+++), mild (++) or severe dysfunction (+), and no contraction (–), which led to termination of each experiment.²⁷

Blood Parameters

Blood parameters (creatinine, urea, GPT/ALT, troponin I, hemoglobin, and leukocytes) were measured using routine hospital laboratory.

T Cell Proliferation Assay and Mixed Lymphocyte Reaction

Following magnetic bead isolation, CD4⁺ T cells were obtained using the human naive CD4⁺ T cell isolation Kit II (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). The analysis of effector T (Teff)-cell proliferation was performed using a carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution assay (5 mmol/L, Invitrogen, Carlsbad, CA). The proliferation of naive (resting) Teff cells were assessed and compared to the proliferation of polyclonal (anti-CD3/anti-CD28) activated Teff cells to verify their capacity of proliferation (maximum stimulus).

The role of RNase A in allogeneic stimulated Teff cells was evaluated using mixed lymphocyte reaction with unmatched and unrelated donor peripheral blood mononuclear cells as described before.²⁸

Teff cell proliferation in mixed lymphocyte reaction was compared both in absence and as well as in presence of RNase A (10 µg RNase A). Analysis was performed in duplicates/triplicates by flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, BD Bioscience, San Jose, CA) of carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution of proliferating cells using the software FlowJo v10 (FlowJo, Tree Star Ashland, OR).²⁸

Analyses of Explanted Grafts

At the termination of the transplantation experiments, the grafts were explanted, weighed, and then analyzed via pathology and quantitative morphological analyses (see Histology, Immunohistochemistry, and Quantitative Morphological

Analyses section). The density of rat heart tissue was determined in 6 cases (1.052 ± 0.062 g/cm³), using the fluid displacement method, described before.²⁹ Briefly, the heart was cut into equidistant parallel slices of ≈ 3 mm thickness, orthogonal to the longitudinal axis of the heart. The slices were placed on the same section surfaces, and every second slab was systematically randomly allocated to heart tissue FACS, while qualitative and quantitative histological and immunohistochemical analyses were performed on the remaining slices (see Histology, Immunohistochemistry, and Quantitative Morphological Analyses section).³⁰

Heart Tissue Flow Cytometry

Collagenase II (Biochrome, Berlin, Germany) digested heart tissue was stained using fluorochrome-conjugated antibodies specific to rat CD45 (APC/Cy7; Biolegend, San Diego, CA), Ly6G (fluorescein isothiocyanate, Abcam, Cambridge, UK), or corresponding isotypes. Leukocyte subgroups were identified by FACS (Galios Flow Cytometer; Beckman Coulter, Pasadena, CA), using Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter, Figure 4).

Histology, Immunohistochemistry, and Quantitative Morphological Analyses

One of the heart tissue slices allocated to qualitative and quantitative histological and immunohistochemical analyses of the POD 1 group was immediately frozen for cryosectioning technique (Tissue Tek; Sakura, Torrance, CA) and stored at -80°C , while the other slices were immersion fixed in neutrally buffered (pH 7.6) 4% formaldehyde solution overnight at room temperature, followed by embedding in paraffin while maintaining their section surface orientation. Paraffin sections (≈ 3 µm thickness) were stained with hematoxylin and eosin, according to standard protocols. For detection of extravascular leukocyte subgroups in the myocardium, immunohistological staining was performed, using specific antibodies directed against macrophages (CD68; Acris, Herford, Germany, and Dako, Eching, Germany), T cells (CD3; Dako and Vector Laboratories, Burlingame, CA), and B cells (CD20; Santa Cruz, Dallas, TX, and Dako). Positive immunoreactivity was detected using the Vectastain ABC-Kit Elite and diaminobenzidine (Dako) as chromophore. Quantitative morphological analyses were performed using stereological methods. The volume densities (stated in %) of the myocardium (myocardocytes and interstitial tissue, excluding myocardial vessels) in the heart ($V_{V(\text{myocardium}/\text{heart})}$), of edema (optically empty extracellular space within the myocardium) in the myocardium ($V_{V(\text{edema}/\text{myocardium})}$), and of macrophages, T cells, and B cells in the myocardium ($V_{V(\text{CD68}+/\text{myocardium})}$, $V_{V(\text{CD3}+/\text{myocardium})}$, $V_{V(\text{CD20}+/\text{myocardium})}$) were calculated from their respective area densities, determined at $\times 200$

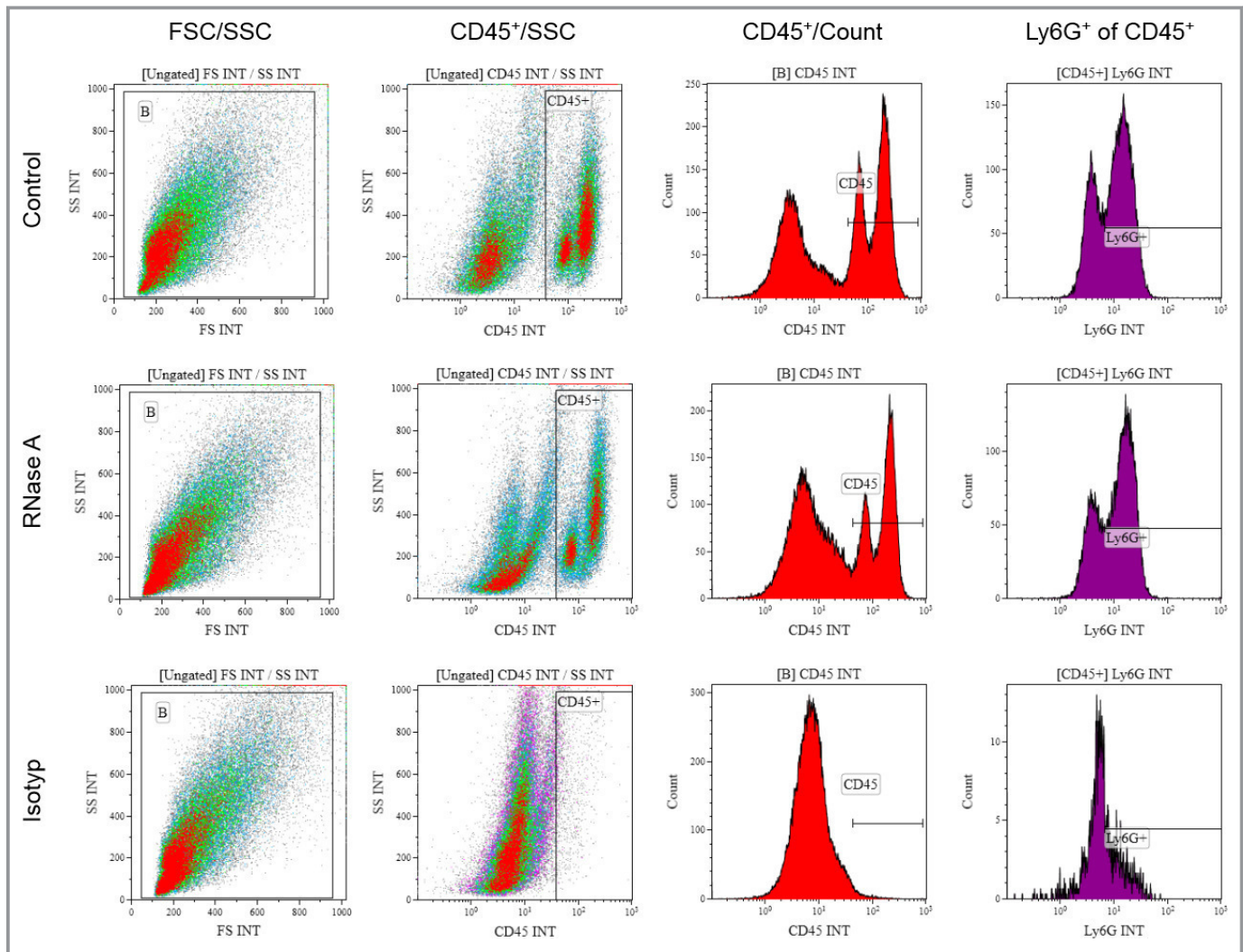


Figure 4. Gating strategy in heart tissue flow cytometry analysis. Cardiac graft tissue was stained for CD45 and Ly6G to quantify infiltration of leukocytes (CD45⁺ cells) or neutrophils (Ly6G⁺ cells), respectively.

magnification in systematically randomly sampled test-fields per case, referring to $10 \pm 0.3\%$ of the total tissue section area, using an automated stereology system (VIS-Visiopharm Integrator System[®] Version 3.4.1.0 with newCAST[®] software; Visiopharm A/S, Hørsholm, Denmark).³¹ The sectional area densities of heart tissue, myocardium, macrophages, CD3-positive T cells, and CD20-positive B cells were determined by point counting. Per case, 800 ± 16 points were counted for determination of $V_V(\text{myocardium}/\text{heart})$, 5000 ± 100 points for $V_V(\text{edema}/\text{myocardium})$, $115\,200 \pm 2304$ points for $V_V(\text{CD3}^+/\text{myocardium})$, and $156\,800 \pm 3136$ points for each $V_V(\text{CD68}^+/\text{myocardium})$ and $V_V(\text{CD20}^+/\text{myocardium})$.³¹ The absolute volumes (stated in mm³) of the heart, the myocardium, and of edema, macrophages, T and B-cells in the myocardium ($V_{(\text{heart})}$, $V_{(\text{myocardium, heart})}$, $V_{(\text{edema, myocardium})}$, $V_{(\text{CD68}^+, \text{myocardium})}$, $V_{(\text{CD3}^+, \text{myocardium})}$, and $V_{(\text{CD20}^+, \text{myocardium})}$) were calculated from the volume densities of the respective parameters and the absolute volume of the corresponding reference

compartments (heart tissue or myocardium). The total volume of the heart was calculated from the weight and the density of the heart tissue. Cryosections were stained for leukocytes (CD45; Abcam Cambridge, UK; dky-anti mouse-Cy3; Jackson Immuno Research, West Grove, PA) and counterstained against α -actinin (ACTN4-Alexa488; Abcam, Cambridge, UK) or specifically for neutrophils (Ly6G, Abcam) and counterstained with phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Analysis of Toxic Side Effects

An assessment of toxic side effects was performed in 9 LEW/OrlRj rats by using the study dose of RNase A (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IV, dissolved in 1 mL saline), as well as a 20-fold higher dose of RNase A (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IV, dissolved in 1 mL saline), and for control 0.9% saline (1 mL IV), each administered every other day for 28 days ($n=3$ in each group). After 4 weeks the rats

Table 1. Blood Parameters of Nontransplanted Lewis (LEW/OrRj) Rats After 28 Days of Intravenous Treatment With Saline or RNase A

Blood Parameters	Treatment Groups		
	Control (Saline)	RNase A (50 µg/kg)	RNase A (1000 µg/kg)
Creatinine, mg/dL	0.7±0.2	0.6±0.0	0.6±0.1
Urea, mg/dL	54±3	41±2	47±3
GPT/ALT, U/L	64±4	44±6	54±3
Leukocytes, K/µL	9.8±1.8	9.2±0.9	10±0.9
Hemoglobin, g/dL	14.7±1.1	16.3±0.2	15.4±0.8

All parameters were in normal range compared to blood parameters of 10-week-old Lewis (LEW/OrRj) rats (normal values provided by Janvier Labs [http://www.janvier-labs.com/tl_files/_media/images/FICHE_RESEARCH_MODELE_LEWIS.pdf, Technical Sheet 2013-06-ENG-RM-08, accessed: January 17, 2016]). Data represent mean±SD; n=3 in each group; RNase A, ribonuclease A; GPT/ALT, glutamate-pyruvate transaminase or alanine transaminase, respectively.

were sacrificed, blood samples were collected, followed by pathological examination according to standardized organ sampling and trimming procedures in rats of the Registry of Industrial Toxicology Animal-data (RITA).^{32–35} All organ samples were paraffin embedded and stained with hematoxylin and eosin; corresponding samples from livers were stained with periodic acid–Schiff according to standard protocols.

Statistical Analyses

Study design and calculated group size are based on the primary end point, the graft survival of bovine RNase

A–treated animals compared to the control group (saline treated). Thus, graft survival in all RNase groups (bovine and human RNases) was analyzed using Kaplan–Meier estimator, and differences were assessed by log-rank test. The graft survival time was specified as median days and interquartile range (IQR). Secondary end points were presented using the magnitude of effects (ie, effect size statistics) and their 95% CI. Standardized mean differences were compared between the groups (d statistics). According to Cohen (adapted for biological sciences, Nakagawa and Cuthill),^{36,37} the d_{Cohen} results were classified in small (≥ 0.2 to < 0.5), medium (≥ 0.5 to < 0.8), and large (≥ 0.8) effects. Numerical data in d statistics are presented as means±SD. Analysis of the effect of RNase A on T cell proliferation was carried out by combining data of 2 independent experiments (n=6). For statistical analyses and diagrams, SPSS Statistics 22 (IBM, Armonk, NY), Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA), and Prism 6.00 for Windows and MacOSX (GraphPad Software, La Jolla, CA) were utilized.

Results

RNase A Treatment Induces No Toxic Side Effects

In accordance with the RITA,^{32–35} treatment of healthy rats with saline or RNase A (even in the 20-fold higher standard dose) showed neither macroscopic nor histological alterations, based on analyses of tissues and organs (including integumentary system, digestive system, respiratory system,

Table 2. Impact of RNase A Treatment on Inflammatory Cell Recruitment Into Graft Tissue

	POD 1			POD 4		
	Control	RNase A	d_{Cohen} (95% CI)	Control	RNase A	d_{Cohen} (95% CI)
Flow cytometry (% of total cells)						
CD45 ⁺	44.9±5.0	35.1±9.2	1.33 (0.14/2.55)	63.9±6.4	63.2±11.9	0.07 (1.17/1.31)
CD45 ⁺ Ly6G ⁺	32.3±5.0	24.2±6.5	1.38 (0.11/2.60)	29.7±6.3	33.2±12.8	0.34 (0.94/1.56)
Quantitative morphological data: volume densities of inflammatory cells in the myocardium (%)						
$V_{\text{V}}(\text{CD68}^+/\text{myocardium})$	0.47±0.05	0.35±0.10	1.53 (0.00/2.76)	4.98±0.48	5.45±0.71	0.77 (0.58/1.97)
$V_{\text{V}}(\text{CD3}^+/\text{myocardium})$	1.91±0.26	1.12±0.15	3.78 (1.47/5.35)	4.12±0.26	1.95±0.14	10.45 (5.12/13.75)
$V_{\text{V}}(\text{CD20}^+/\text{myocardium})$	0.34±0.05	0.25±0.03	2.34 (0.57/3.66)	1.87±0.30	1.09±0.20	3.07 (1.04/4.51)
Quantitative morphological data: total volumes of inflammatory cells in the myocardium (mm ³)						
$V_{\text{V}}(\text{CD68}^+, \text{myocardium})$	3.9±0.7	2.6±0.8	1.77 (0.17/3.02)	46.2±8.5	41.8±6.1	0.53 (0.78/1.73)
$V_{\text{V}}(\text{CD3}^+, \text{myocardium})$	15.8±2.9	8.3±1.4	3.33 (1.2/4.82)	38.4±3.6	14.9±2.3	7.83 (3.73/10.4)
$V_{\text{V}}(\text{CD20}^+, \text{myocardium})$	2.8±0.5	1.9±0.3	2.34 (0.62/3.76)	17.1±1.9	8.1±1.7	4.43 (1.85/6.15)

Following tissue digestion of explanted hearts and flow cytometry, the degree of infiltration of leukocytes (CD45⁺ cells) and neutrophils (CD45⁺Ly6G⁺ cells) in grafts derived from controls and the RNase A treatment group was determined as indicated. Volume densities of macrophages ($V_{\text{V}}(\text{CD68}^+/\text{myocardium})$), T cells ($V_{\text{V}}(\text{CD3}^+/\text{myocardium})$), and B cells ($V_{\text{V}}(\text{CD20}^+/\text{myocardium})$) in the myocardium, and total volumes of macrophages ($V_{\text{V}}(\text{CD68}^+, \text{myocardium})$), T cells ($V_{\text{V}}(\text{CD3}^+, \text{myocardium})$), and B cells ($V_{\text{V}}(\text{CD20}^+, \text{myocardium})$) in the myocardium of explanted beating grafts at POD 1 and POD 4. Data represent means±SD; n=5 in each group; POD, postoperative day; RNase A, ribonuclease A; d_{Cohen} , effect size according to Cohen,^{36,37} classified in small (≥ 0.2 to < 0.5), medium (≥ 0.5 to < 0.8), and large (≥ 0.8) effects; CD, cluster of differentiation.

male genital system, endocrine system, urinary system, nervous system, musculoskeletal system, cardiovascular system, and lymphoreticular system). Within the 4 weeks of treatment with saline or RNase A, all animals increased weight without any differences (by $13.8 \pm 1.9\%$ in control group, $14.2 \pm 0.5\%$ in RNase A–treated animals with study dose, and $13.5 \pm 3.6\%$ in overdosed RNase A–treated animals, small effects according to Cohen’s effect size statistics). After this period of time, the levels of blood parameters of animals treated with RNase A were comparable with those that received saline treatment (Table 1).

Impact of RNase A Treatment on Leukocyte Activation and Recruitment

Following the described procedures of heterotopic heart transplantation, quantitative morphological analyses and FACS analyses, particularly regarding cell infiltration, were performed in beating grafts explanted at POD 1 and POD 4 (Table 2 and Figure 5, including representative immunofluorescence pictures).

After transplantation, the total number of leukocytes (CD45⁺) detected in the grafts by FACS were lower in the

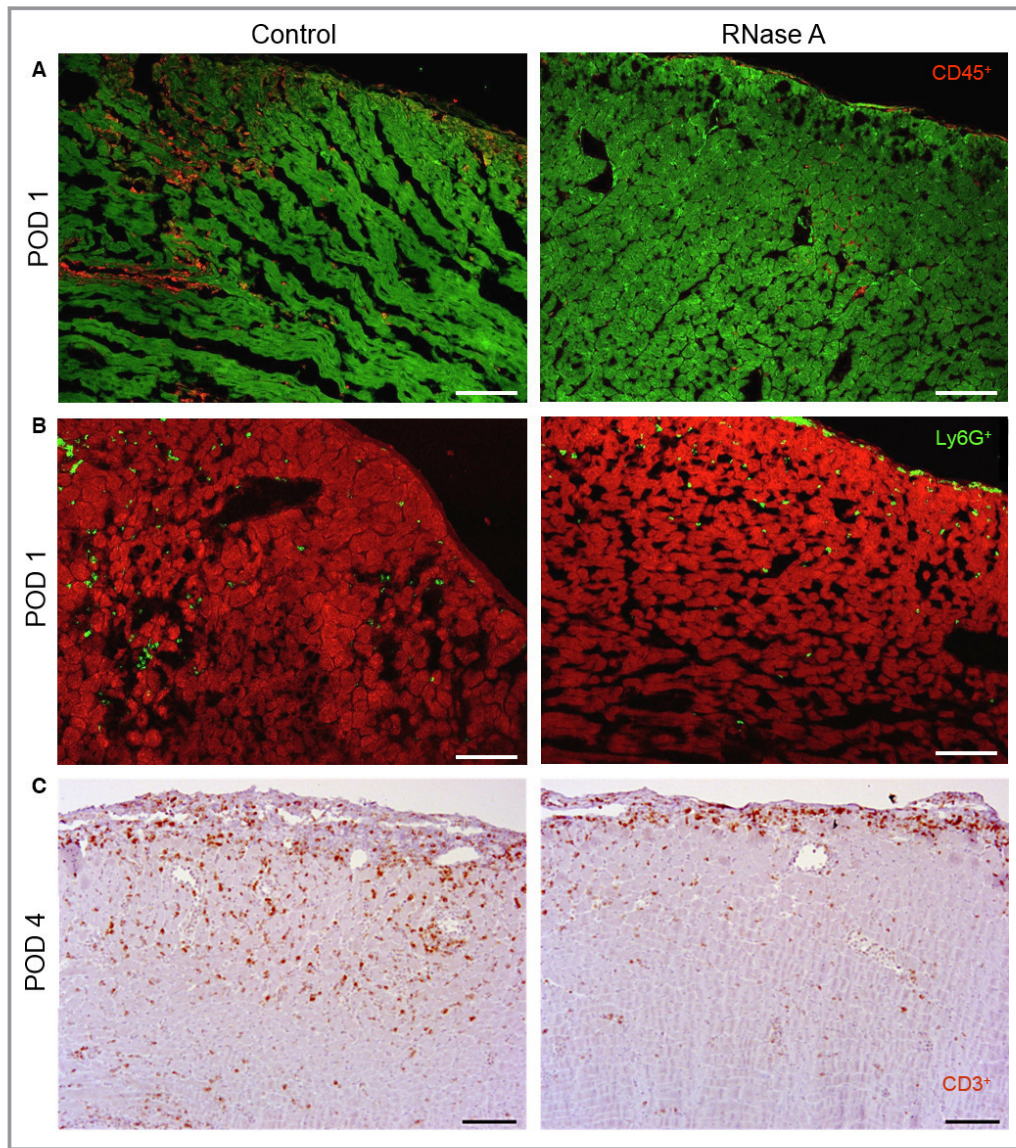


Figure 5. Infiltration of inflammatory and immune cells in grafted tissue. A, The distribution of leukocytes (CD45⁺ cells, red) in grafted heart tissue (green: α -actin) at POD 1 in the control and RNase A treatment groups is depicted by representative pictures; immunofluorescence was carried out with frozen heart tissue. B, Likewise, the distribution of neutrophils (Ly6G⁺ cells, green) at POD 1 for the control and RNase A groups is shown (red: Phalloidin counterstain for actin). C, The distribution of T cells (CD3⁺ cells, brown, IHC staining) in paraffin sections of explanted hearts at POD 4 is indicated for the control and RNase A treatment group in representative pictures. Left ventricle, Scale bars = 100 μ m. IHC indicates immunohistochemistry; POD, postoperative day.

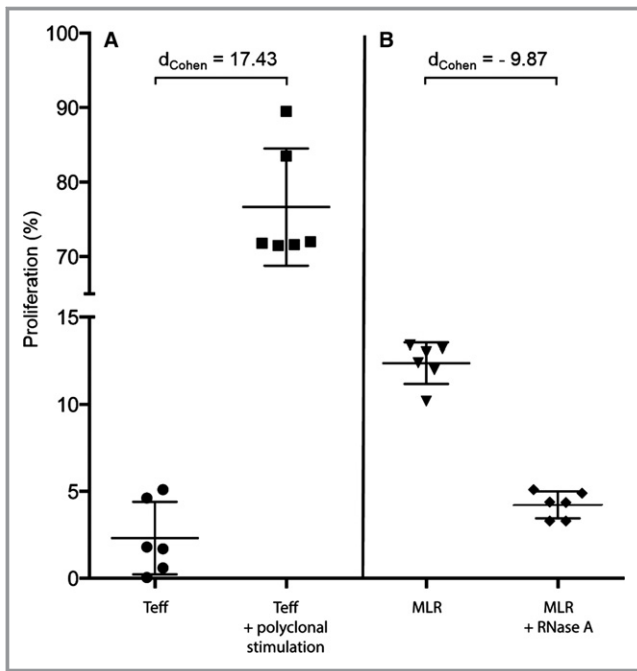


Figure 6. Influence of RNase A on mixed lymphocyte reaction. A, $CD4^+$ Teff cells were isolated from naive human PBMCs and exposed to buffer only or towards polyclonal antiCD3/antiCD28 antibodies; proliferation of resting Teff cells was carried out by a CFSE dilution assay. B, The proliferation of allogeneic stimulated Teff cells was analyzed in MLR (co-culture of isolated Teff cells with donor PBMCs in a ratio of 1:4) in the absence or presence of RNase A. Data represent the analysis of 2 independent experiments ($n=6$) and are shown as means \pm SD. CFSE indicates carboxyfluorescein succinimidyl ester; MLR, mixed lymphocyte reaction; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; Teff, effector T cell.

RNase A treatment group at POD 1 but no differences toward the control group were noted at POD 4. Posttransplantation on POD 1, higher numbers of neutrophils ($CD45^+Ly6G^+$) were counted in the grafts of saline-treated rats, whereas on POD 4 neutrophils showed a higher number in the grafts of RNase A-treated rats. Saline-treated animals, which received no additional immunosuppressive drugs, showed a diffuse infiltration of macrophages ($CD68^+$), T cells ($CD3^+$), and B cells ($CD20^+$) on POD 1 and POD 4. In the RNase A treatment group, reduced infiltration of macrophages and T and B cells into the graft was seen at POD 1 and especially at POD 4.

Influence of RNase A Treatment on Proliferation of T Effector Cells

Unstimulated Teff cells exhibited a fraction of $2.2\pm 1.2\%$ proliferating cells, as determined by FACS. This value increased to $77.6\pm 6.0\%$ following exposure toward anti-CD3/anti-CD28 polyclonal stimulus (large effect according to Cohen's effect size statistics, $d_{Cohen}=17.43$, 95% CI 9.55/22.61, Figure 6A).

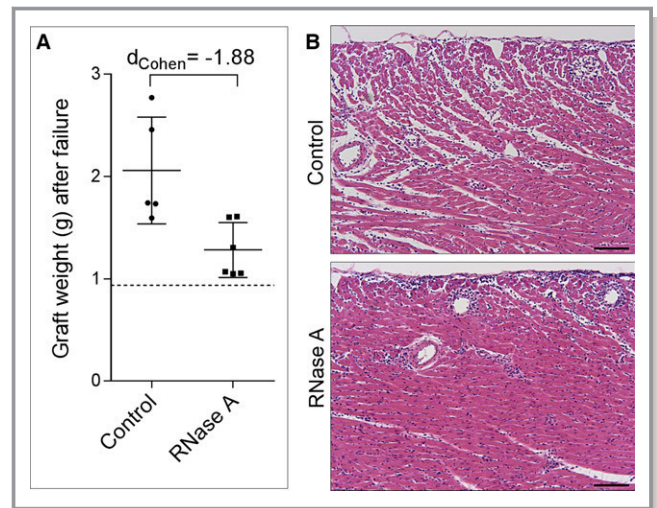


Figure 7. Graft weight upon complete dysfunction and explantation. A, The weight of grafted hearts was determined in the control and RNase A group as indicated, compared to the average weight of hearts prior to implantation (dashed line). B, Paraffin sections (left ventricle, hematoxylin and eosin staining) of explanted hearts at POD 4 show leukocyte infiltration and increased intercellular edema formation in the control group as compared to the RNase A group; scale bars 100 μ m. POD indicates postoperative day.

Regarding the results of the mixed lymphocyte reaction in allogeneic co-culture assays with unmatched and unrelated donor peripheral blood mononuclear cells, Teff cells showed a proliferative capacity of up to $12.0\pm 1.0\%$, whereas in the presence of RNase A (10 μ g/well) this value was decreased to $4.2\pm 0.5\%$ of all analyzed Teff cells (large effect, $d_{Cohen}=9.87$, 95% CI 5.29/12.92, Figure 6B).

Reduction of Edema Formation by RNase A Treatment

The mean pre-implantation weight of the donor grafts in the graft survival groups was 0.94 ± 0.03 g. After being rejected, the weight of the grafts in the saline treatment group showed an increase to 2.06 ± 0.52 g, as opposed to a much smaller increase in donor graft weight in the RNase A treatment group (1.28 ± 0.27 g, large effect, $d_{Cohen}=1.88$, 95% CI 0.41/3.07; Figure 7A). Quantitative morphological analyses evidenced less edema formation in RNase A-treated grafts as compared to the saline-treated grafts, both at POD 1 and at POD 4 (Table 3 and Figure 7B).

Prevention of Left Ventricular Thrombus Formation by RNase A Treatment

Rejected cardiac grafts of the saline as well as inactive RNase 1 treatment groups showed thrombus formation within the left ventricle as described in other studies using the same

Table 3. Impact of RNase A Treatment on the Extent of Inflammatory Edema in POD 1 and POD 4 Beating Grafts

	POD 1			POD 4		
	Control	RNase A	d _{Cohen} (95% CI)	Control	RNase A	d _{Cohen} (95% CI)
Volume densities (%)						
V _{V(myocardium/heart)}	92.9±1.1	91.7±1.2	1.49 (0.02/2.27)	90.7±3.2	87.4±2.2	1.2 (0.24/2.41)
V _{V(edema/myocardium)}	5.8±0.8	4.0±0.4	2.94 (0.95/4.35)	14.7±1.6	6.8±0.9	6.18 (2.84/8.33)
Absolute volumes (mm³)						
V _{V(heart)}	887.7±83	799.3±46.9	1.31 (0.16/2.53)	1009.2±97.3	876.4±57.6	1.65 (0.09/2.98)
V _{V(myocardium, heart)}	824.2±68.8	732.9±37.6	1.65 (0.09/2.89)	916.2±103.7	765.2±43.0	1.89 (0.26/3.15)
V _{V(edema, myocardium)}	47.8±9.4	29.1±2.0	2.74 (0.83/4.12)	135.4±20.3	51.7±8.1	5.36 (2.38/7.3)

Volume densities of the myocardium in the heart ($V_{V(\text{myocardium/heart})}$) and of edema in the myocardium ($V_{V(\text{edema/myocardium})}$). Total volumes of the heart ($V_{V(\text{heart})}$), of the myocardium ($V_{V(\text{myocardium, heart})}$), and of myocardial edema ($V_{V(\text{edema, myocardium})}$). Data represent means±SD; n=5 in each group; POD, postoperative day; RNase A, ribonuclease A; d_{Cohen}, effect size according to Cohen,^{36,37} classified in small (≥ 0.2 to < 0.5), medium (≥ 0.5 to < 0.8), and large (≥ 0.8) effects.

heterotopic abdominal heart transplantation technique.³⁸ Grafts in the RNase A and active RNase 1 treatment groups maintained an unaltered left ventricle lumen even after loss of graft function as verified by transabdominal echocardiography (Figure 8).

Prolongation of Graft Survival by RNase A Treatment

As a primary biomarker for cardiac injury,³⁹ serum troponin I was measured in transplanted animals. In comparison to the

control group, troponin I levels were clearly lower in the RNase A treatment group, both at POD 1 ($27.23 \pm 11.87 \mu\text{g/L}$ versus $5.32 \pm 1.35 \mu\text{g/L}$, large effect according to Cohen's effect size statistics, d_{Cohen}=2.43, 95% CI 0.51/3.81) and POD 4 ($4.07 \pm 1.21 \mu\text{g/L}$ versus $0.78 \pm 0.56 \mu\text{g/L}$, large effect, d_{Cohen}=3.49, 95% CI 0.54/5.03). In addition to the decreased cardiac graft injury indicated by low troponin I levels, a tendency towards a lower cellular International Society for Heart and Lung Transplantation rejection grade was found in RNase A treatment at POD 4 (Table 4).

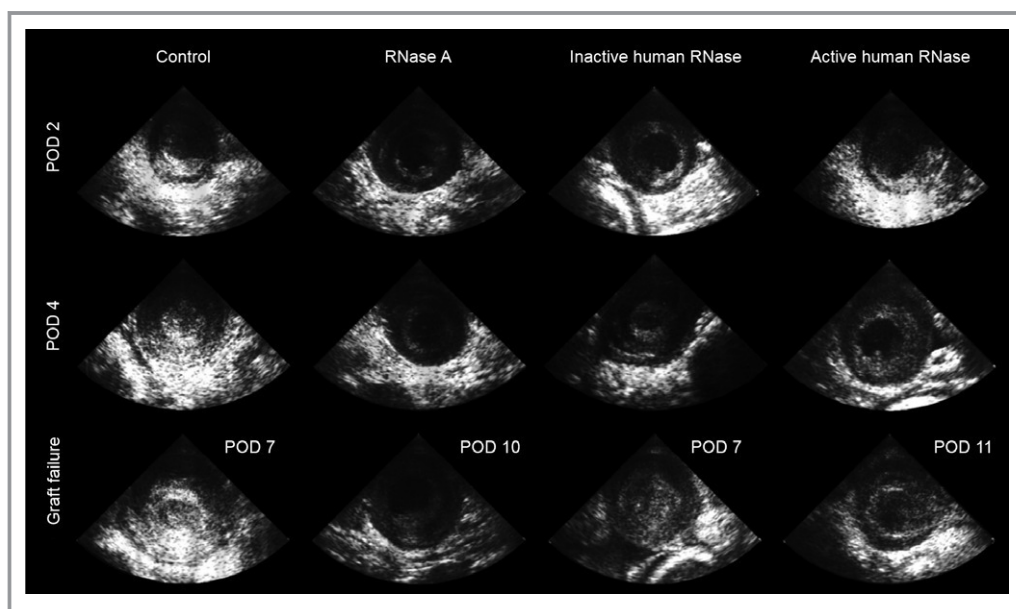


Figure 8. Thrombus formation in abdominal grafts as analyzed by echocardiography. At POD 2, POD 4, and the (variable) day of complete graft failure, echocardiography of left ventricles (LV) was performed on recipients of all treatment groups (bovine RNase A, inactive human RNase 1, active human RNase 1) and compared to control group (penetration depth 2 cm, 88 Hz). Note that rejected grafts presented LV thrombus formation in control and inactive human RNase 1 groups but not in bovine RNase A and active human RNase 1 treated hearts. POD indicates postoperative day.

Table 4. Grading of Acute Cellular Rejection

Treatment Groups	Grade 0R (No Rejection)	Grade 1R (Mild Rejection)	Grade 2R (Moderate Rejection)	Grade 3R (Severe Rejection)
Control (n)	0	1	3	1
RNase A (n)	0	2	3	0

At postoperative day 4, explanted beating grafts were graded based on a standardized grading system for the pathologic diagnosis of acute cellular rejection in cardiac biopsies recommended by the International Society for Heart and Lung Transplantation.² n=5 in each treatment group. RNase A indicates ribonuclease A.

Treatment with RNase A improved cardiac median graft survival to 10.5 days (IQR 1.8) compared to 6.5 days (IQR 1.0) in saline-treated animals ($P=0.001$, Figure 9A).

While treatment with enzymatically inactive RNase 1 revealed a median graft survival time similar to that of the saline control group (8.0 days, IQR 0.5), a prolonged graft survival was observed for the treatment group with active RNase 1 (11.0 days, IQR 0.3, $P=0.007$, Figure 9B). These results indicate that the efficacy of cardioprotection depends on the ribonucleolytic activity of RNase 1.

Discussion

The use of RNase as a potential drug in the immediate transplantation surrounding is based on its reported potent tissue- and cardioprotective functions. RNase A is an endogenous natural enzyme with the highest structural stability among all mammalian proteins, and has been demonstrated in several experimental in vivo studies of our group to counteract the damaging effect of eRNA in cardiovascular diseases. Here, the administration of even

high doses of RNase A in rats for 28 days did not induce any destructive alterations in tissues and organs, as evidenced by macroscopic and histopathologic analyses.

Moreover, extracellular RNase appears to be a safe natural drug, since it acts in a nontoxic manner due to the ubiquitous presence of a highly reactive RNase inhibitor,^{40,41} which prevents the destruction of intracellular RNAs upon exposure of RNase in all cell types. Overall, administration of both active pancreatic bovine RNase A as well as recombinant human RNase 1 resulted in a prolongation of graft survival in the described heart transplantation model, whereas enzymatically inactive RNase 1 and buffer alone were similarly ineffective. These data support the hypothesis that RNase 1 serves as a possible interventional regimen upon graft survival in heterotopic heart transplantation by degrading and removing detrimental eRNA.

Acute cellular rejection of a transplanted organ is primarily a T cell-mediated event with infiltration of lymphocytes and monocytes/macrophages and resultant myocytolysis.⁴² In a previous study of our group, eRNA was demonstrated to induce leukocyte adhesion, which was mediated by activation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor-receptor-2 system and dependent on intercellular adhesion molecule-1 and the β 2-integrin Mac-1. Moreover, eRNA showed pro-inflammatory properties by inducing tumor necrosis factor α release from monocytic cells.⁴ In the present study, RNase A-treated grafts showed a reduction of mostly T cells but also of B cells, indicating that RNase treatment resulted in eRNA degradation and hence reduced immune cell recruitment.

Yet, these connections still remain to be established in detail for the situation of heart transplantation. Another

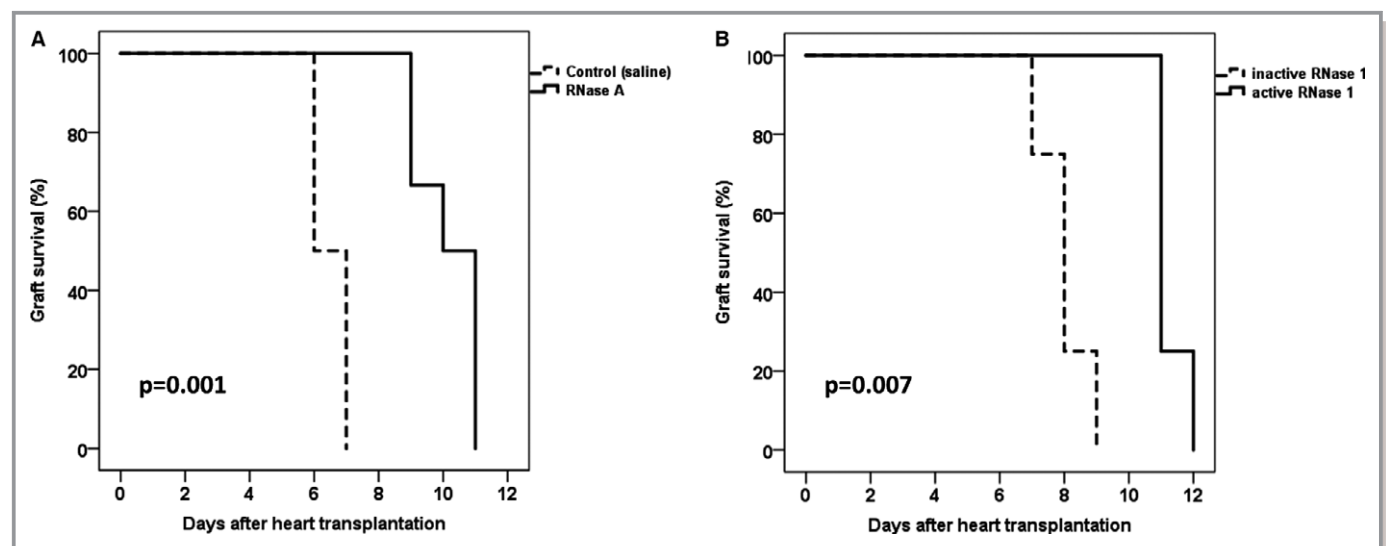


Figure 9. Kaplan–Meier estimation of graft survival. In both comparisons, the active enzyme (RNase A and RNase 1) was superior to the control (A) and accordingly inactive RNase 1 (B).

important factor in transplantation is I/R injury, which is associated with infiltration of neutrophils and macrophages.² Macrophages have been shown to contribute to I/R injury in solid organ transplantation by generating inflammatory mediators.⁴³ In the RNase A treatment group of the present study, reduced numbers of neutrophils and macrophages were detected in graft tissue in the early posttransplantation period as compared to the control group, reflecting decreased signs of I/R injury. Moreover, substantially decreased troponin I levels presenting the primary biomarker of cardiac damage³⁹ were found in the RNase A treatment group as well. These promising results are reminiscent of the outcome of a recent study of cardiac I/R injury in rodents, where the molecular interplay between eRNA and tumor necrosis factor α was shown to be responsible to a large extent for myocardial damage and infarct size and where RNase A administration resulted in a significant reduction of this pathology.⁸

In case of graft rejection after transplantation, I/R injury accounts for accelerating transplant vasculopathy,⁴⁴ which is associated with endothelial dysfunction⁴⁵ that appears to be related to alloimmune responses such as episodes of acute and chronic allograft rejection and to nonalloimmunologic factors such as organ preservation, I/R injury, inflammation, and infections as well as to metabolic risk factors such as hyperlipidemia, diabetes, and hypertension.⁴⁶ There are several mechanistic overlaps in the development of transplant vasculopathy and atherosclerosis.⁴⁷ RNase was discussed to serve as a new treatment option against atherosclerosis.⁷ However, it remains to be investigated whether RNase administration could serve as a treatment option to prevent long-term transplant vasculopathy in a model of chronic rejection.

Acute or chronic graft failure is based on combined processes, such as inflammation, thrombus formation, endothelium damage, and edema formation, which are associated with the appearance of eRNA, as demonstrated in several former studies. There, RNase application has been shown to remove the exposed eRNA that serves as cofactor for coagulation proteins and cytokines or permeability factors such as vascular endothelial growth factor A.^{5,6,23} In the present study of acute graft rejection, a similar mechanism is proposed, whereby treatment with RNase A resulted in diminished edema and thrombus formation related to increased graft survival. In fact, expression of vascular endothelial growth factor has been related to endothelial cell activation and phenotypic changes found in the microcirculation of cardiac allografts,⁴⁸ thereby supporting our contention. Although ventricular thrombosis plays no role in clinical heart transplantation, in the presented animal model of unloaded left ventricle, thrombosis development is a common event.³⁸ It is worth mentioning that all animals treated with active RNase exhibited no thrombosis. This supports the hypothesis that RNase counteracts the eRNA-

mediated activation of the contact phase of intrinsic blood coagulation.⁶

Finally, RNase may promote an immunosuppressive function, as indicated by its suppressive capacity on proliferating effector T cells verified by mixed lymphocyte reaction. Interestingly, it has been described already in the 1960s that intraperitoneal injection of an α_2 -protein fraction from serum prolongs the survival of rat skin homografts by inhibition of antibody production to antigens.⁴⁹ It was postulated that the respective fraction that contained RNase⁵⁰ temporarily prevented antibody synthesis.⁵¹ Since after allogeneic transplantation, cellular rejection mechanisms are most important, humoral rejection mechanisms were not our major concern. Further studies dealing with antibody-mediated rejection, eg, with sensitized animals,⁵² might help to clarify the contribution of eRNA and the possibility of RNase treatment in this respect.

However, the current experimental model provides new insights into the versatile role of ribonuclease as a potential drug to improve graft survival and that allows deciphering of the underlying mechanisms in more detail.

Conclusions

Our findings present evidence that RNase treatment provides a beneficial adjuvant therapy in heart transplantation, although it is difficult in the present model to differentiate between the detrimental impact of I/R injury versus rejection reaction. Mechanistically, we propose that enzymatically active RNase improves the survival of cardiac grafts by counteracting the adverse activities of eRNA and by acting as a yet to be defined mild immunosuppressive agent. Thus, RNase treatment should be considered as a universal potent adjuvant in situations of critical reperfusion such as percutaneous coronary intervention, cardiac surgery, or heart transplantation.

Acknowledgments

We thank Brita Zugenmaier for proofreading and the colleagues of the Walter Brendel Centre of Experimental Medicine (Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany), particularly Franz Singer for his technical support concerning surgical equipment, and Mehdi Shakarami, head of animal facility, and his staff for the competency in animal housing. In particular, we are grateful to Sven Reese (Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany) for statistical advice and introduction to the method of effect size statistics according to Cohen.

Sources of Funding

This work was in part supported by the Collaborative Research Center (SFB-TR) 127, the Excellence Cluster

Cardio-Pulmonary System (ECCPS) of the Justus-Liebig-University, Giessen (Germany), and the individual grant FI-543/2-2, all funded by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, Germany), as well as by the von-Behring-Röntgen Foundation (Marburg, Germany) and the LOEWE-Priority Program “Medical RNomics” (Wiesbaden, Germany).

Disclosures

None.

References

1. Billingham ME, Cary NR, Hammond ME, Kemnitz J, Marboe C, McCallister HA, Snovar DC, Winters GL, Zerbe A. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. *J Heart Transplant.* 1990;9:587–593.
2. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Marboe CC, McManus B, Reed EF, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose AG, Rose M, Suci-Focia N, Zeevi A, Billingham ME. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:1710–1720.
3. Fischer S, Preissner KT. Extracellular nucleic acids as novel alarm signals in the vascular system. Mediators of defence and disease. *Hamostaseologie.* 2013;33:37–42.
4. Fischer S, Grantzow T, Pagel JI, Tschernatsch M, Sperandio M, Preissner KT, Deindl E. Extracellular RNA promotes leukocyte recruitment in the vascular system by mobilising proinflammatory cytokines. *Thromb Haemost.* 2012;108:730–741.
5. Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, Zheleva K, Hocke A, Hippenstiel S, Preissner KT. Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood.* 2007;110:2457–2465.
6. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl ML, Sedding D, Massberg S, Gunther A, Engelmann B, Preissner KT. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:6388–6393.
7. Simsekylmaz S, Cabrera-Fuentes HA, Meiler S, Kostin S, Baumer Y, Liehn EA, Weber C, Boisvert WA, Preissner KT, Zerneck A. Role of extracellular RNA in atherosclerotic plaque formation in mice. *Circulation.* 2014;129:598–606.
8. Cabrera-Fuentes HA, Ruiz-Meana M, Simsekylmaz S, Kostin S, Inserte J, Saffarzadeh M, Galuska SP, Vijayan V, Barba I, Barreto G, Fischer S, Lochnit G, Ilinskaya ON, Baumgart-Vogt E, Boning A, Lecour S, Hausenloy DJ, Liehn EA, Garcia-Dorado D, Schluter KD, Preissner KT. RNase1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumour necrosis factor- α in cardiac ischaemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost.* 2014;112:1110–1119.
9. Schein CH. From housekeeper to microsurgeon: the diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases. *Nat Biotechnol.* 1997;15:529–536.
10. Dubos RJ. The decomposition of yeast nucleic acid by a heat resistant enzyme. *Science.* 1937;85:549–550.
11. Kunitz M. Isolation from beef pancreas of a crystalline protein possessing ribonuclease activity. *Science.* 1939;90:112–113.
12. Kunitz M. Crystalline ribonuclease. *J Gen Physiol.* 1940;24:15–32.
13. Smyth DG, Stein WH, Moore S. The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations. *J Biol Chem.* 1963;238:227–234.
14. Gutte B, Merrifield RB. The total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity. *J Am Chem Soc.* 1969;91:501–502.
15. Beintema JJ, Wietzes P, Weickmann JL, Glitz DG. The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease. *Anal Biochem.* 1984;136:48–64.
16. Weickmann JL, Elson M, Glitz DG. Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease. *Biochemistry.* 1981;20:1272–1278.
17. Landre JB, Hewett PW, Olivot JM, Friedl P, Ko Y, Sachinidis A, Moenner M. Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1). *J Cell Biochem.* 2002;86:540–552.
18. Fischer S, Nishio M, Dadkhahi S, Gansler J, Saffarzadeh M, Shibamiya A, Kral N, Baal N, Koyama T, Deindl E, Preissner KT. Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2011;105:345–355.
19. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke.* 2004;35:566–571.
20. Rottger C, Bachmann G, Gerriets T, Kaps M, Kuchelmeister K, Schachenmayr W, Walberer M, Wessels T, Stolz E. A new model of reversible sinus sagittalis superior thrombosis in the rat: magnetic resonance imaging changes. *Neurosurgery.* 2005;57:573–580; discussion 573-580.
21. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union.* 2010. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063>. Accessed March 4th, 2016.
22. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1969;57:225–229.
23. Walberer M, Tschernatsch M, Fischer S, Ritschel N, Volk K, Friedrich C, Bachmann G, Mueller C, Kaps M, Nedelmann M, Blaes F, Preissner KT, Gerriets T. RNase therapy assessed by magnetic resonance imaging reduces cerebral edema and infarction size in acute stroke. *Curr Neurovasc Res.* 2009;6:12–19.
24. Fischer S, Gesierich S, Griemert B, Schanzer A, Acker T, Augustin HG, Olsson AK, Preissner KT. Extracellular RNA liberates tumor necrosis factor- α to promote tumor cell trafficking and progression. *Cancer Res.* 2013;73:5080–5089.
25. Wexler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 2005;19:1872–1874.
26. Sznajd J, Magdon M, Naskalski JW, Uracz R, Wojcikiewicz O. Serum ribonuclease activity in acute myocardial infarction. *Cor Vasa.* 1981;23:241–247.
27. Gordon CR, Matthews MS, Lefebvre DR, Strande LF, Marra SW, Guglielmi M, Hollenberg SM, Hewitt CW. A new modified technique for heterotopic femoral heart transplantation in rats. *J Surg Res.* 2007;139:157–163.
28. Noyan F, Lee YS, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Taubert R, Warnecke G, Knoefel AK, Schulde E, Olek S, Manns MP, Jaeckel E. Isolation of human antigen-specific regulatory T cells with high suppressive function. *Eur J Immunol.* 2014;44:2592–2602.
29. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie.* 1970;26:57–60.
30. Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology.* Coleraine, UK: QTP Publications; 2005.
31. Weibel ER. *Stereological Methods, 1: Practical Methods for Biological Morphometry.* London: Academic Press; 1979.
32. Bahnemann R, Jacobs M, Karbe E, Kaufmann W, Morawietz G, Nolte T, Rittinghausen S. RITA—registry of industrial toxicology animal data—guides for organ sampling and trimming procedures in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 1995;47:247–266.
33. Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, Klapwijk J, Elwell MR, Lenz B, O'Sullivan MG, Roth DR, Wadsworth PF, Group R, Group N. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice—part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol.* 2004;55:413–431.
34. Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Bube A, Keane K, Halm S, Heuser A, Hellmann J, Group R, Group N. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice—part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol.* 2004;55:433–449.
35. Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Morawietz G, Deslex P, Keenan C, Mahrt CR, Nolte T, Robinson M, Stuart BP, Deschl U, Group R, Group N. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice—part 1. *Exp Toxicol Pathol.* 2003;55:91–106.
36. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences.* 2nd ed. Hillsdale, NJ: Erlbaum; 1988.
37. Nakagawa S, Cuthill IC. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2007;82:591–605.
38. Wen P, Wang X, Li T, Zhang B, Sun X, Qiu G, Fan J, Xing T, Luo Q, Tang H, Peng Z. Establishment of a novel volume-loaded heterotopic heart transplantation model in rats. *J Surg Res.* 2013;183:435–441.
39. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE Jr, Ganiats TG, Holmes DR Jr, Jaffe AS, Jneid H, Kelly RF, Kontos MC, Levine GN, Liebson PR, Mukherjee D, Peterson ED, Sabatine MS, Smalling RW, Zieman SJ; Members AATF. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation

- acute coronary syndromes: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;130:2354–2394.
40. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2005;80:349–374.
 41. Johnson RJ, McCoy JG, Bingman CA, Phillips GN Jr, Raines RT. Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein. *J Mol Biol*. 2007;368:434–449.
 42. Lindenfeld J, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, Mestroni L, Page RL II, Kobashigawa J. Drug therapy in the heart transplant recipient: part I: cardiac rejection and immunosuppressive drugs. *Circulation*. 2004;110:3734–3740.
 43. Salehi S, Reed EF. The divergent roles of macrophages in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20:446–453.
 44. Goto R, Issa F, Heidt S, Taggart D, Wood KJ. Ischemia-reperfusion injury accelerates human antibody-mediated transplant vasculopathy. *Transplantation*. 2013;96:139–145.
 45. Valantine HA. Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant “atheroma”. *Transplantation*. 2003;76:891–899.
 46. Vassalli G, Gallino A, Weis M, von Scheidt W, Kappenberger L, von Segesser LK, Goy JJ; Working Group Microcirculation of the European Society of C. Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *Eur Heart J*. 2003;24:1180–1188.
 47. Guethoff S, Grinninger C, Kaczmarek I. Everolimus: sidekick against atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 2013;231:27–28.
 48. Torry RJ, Labarrere CA, Torry DS, Holt VJ, Faulk WP. Vascular endothelial growth factor expression in transplanted human hearts. *Transplantation*. 1995;60:1451–1457.
 49. Mowbray JF. Effect of large doses of an alpha2-glycoprotein fraction on the survival of rat skin homografts. *Transplantation*. 1963;1:15–20.
 50. Mowbray JF, Hargrave DC. Further studies on the preparation of the immunosuppressive alpha-2 protein fraction from the serum and its assay in mice. *Immunology*. 1966;11:413–419.
 51. Mowbray JF, Scholand J. Inhibition of antibody production by ribonucleases. *Immunology*. 1966;11:421–426.
 52. Huang G, Wilson NA, Reese SR, Jacobson LM, Zhong W, Djamali A. Characterization of transfusion-elicited acute antibody-mediated rejection in a rat model of kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2014;14:1061–1072.



Ribonuclease (RNase) Prolongs Survival of Grafts in Experimental Heart Transplantation

Eike Kleinert, Martin C. Langenmayer, Bruno Reichart, Jana Kindermann, Barbara Griemert, Andreas Blutke, Kerstin Troidl, Tanja Mayr, Tobias Grantzow, Fatih Noyan, Jan-Michael Abicht, Silvia Fischer, Klaus T. Preissner, Ruediger Wanke, Elisabeth Deindl and Sonja Guethoff

J Am Heart Assoc. 2016;5:e003429; originally published April 27, 2016;

doi: 10.1161/JAHA.116.003429

The *Journal of the American Heart Association* is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Online ISSN: 2047-9980

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://jaha.ahajournals.org/content/5/5/e003429>

Subscriptions, Permissions, and Reprints: The *Journal of the American Heart Association* is an online only Open Access publication. Visit the Journal at <http://jaha.ahajournals.org> for more information.

V. DISKUSSION

1. Das Tiermodell

In dieser Studie wurden ausschließlich männliche Brown Norway/OrlRj (Spender) und Lewis/OrlRj (Empfänger) Ratten als Versuchstier verwendet.

Die Ratte ist ein relativ kostengünstiges Versuchstier und in Haltung, Pflege und Platzbedarf gut zu handhaben. Im Vergleich zur Maus haben Ratten einen deutlich größeren Gefäßdurchmesser, dies erleichtert die Transplantationsmethode und führt so zu besserem Erfolg der Operation. Zudem ist das heterotop abdominale Transplantationsmodell an der Ratte gut beschrieben (Ono und Lindsey, 1969). Es wurden ausschließlich männliche Ratten verwendet, um einen Einfluss von zyklusbedingten Hormonschwankungen bei weiblichen Ratten auf die Studienergebnisse auszuschließen. Zudem wurde durch Takami et al. (1995) beschrieben, dass weibliche Empfängerratten eine frühere Transplantatabstoßung als männliche Empfängertiere zeigen. Das Transplantatüberleben der weiblichen Empfängertiere lag hier bei nur 66% des Transplantatüberlebens von männlichen Empfängern. Um einen vergleichbaren biologischen Hintergrund der Versuchstiere zu gewährleisten, wurden ausschließlich homogene Tiergruppen mit einheitlichem Alter verwendet. Als Spender wurden Brown-Norway/OrlRj-Ratten und als Empfänger Lewis/OrlRj-Ratten verwendet, um ein allogenes Transplantationsmodell zu untersuchen. Dies ähnelt einer Herztransplantation in der Humanmedizin, wenn Spender und Empfänger sehr gut zueinander passen. Würde eine Transplantation durchgeführt werden, bei der die Individuen der Spender- und Empfängerratten homozygote Allele auf allen Genloci besitzen (Bsp. Spender und Empfänger Lewis/OrlRj-Ratten), wäre dies ein isogenes Transplantationsmodell und ähnelte der Herztransplantation von eineiigen Zwillingen in der Humanmedizin. Diese Situation, dass Empfänger und Spender einer Herztransplantation eineiige Zwillinge sind, kommt in der Humanmedizin höchst selten vor.

2. Das Transplantationsmodell

In dieser Studie wurde das Modell der heterotop abdominalen Herztransplantation an Ratten verwendet. Dieses Modell wurde von verschiedenen Autoren detailliert beschrieben und stellt für die präklinische Untersuchung eines potenziell neuen Therapeutikums für die Herztransplantation ein erfolgsversprechendes Tiermodell dar.

1964 führte Abbot die erste abdominale Herztransplantation an Versuchstieren durch (Abbott et al., 1964). Bei Abbotts Methode wurden die Spenderherzen allerdings an die Endstümpfe der *Vena cava caudalis* und der *Aorta abdominalis* anastomosiert und die beiden Hauptgefäße kaudal davon ligiert. Dies führte zu einer verminderten Durchblutung der kaudalen Organe und Hintergliedmaßen.

Ono und Lindsey modifizierten 1969 diese Methode, indem sie nach Unterbindung der Blutzirkulation der Empfängergefäße eine End-zu-Seit-Anastomose verwendeten (Ono und Lindsey, 1969).

Es gibt zusätzlich zur heterotop abdominalen Transplantation auch die Möglichkeit der heterotop zervikalen (Ma und Wang, 2011) und heterotop femoralen (Gordon et al., 2007) Herztransplantation.

Alle Methoden führen zu einem ähnlichen Erfolg nach Transplantation. Als beschriebene Vorteile der femoralen und zervikalen Transplantationsmethode sind eine kürzere Ischämiezeit, schnellerer Operationsablauf und weniger Blutungsneigungen beschrieben. Allerdings besteht bei diesen beiden Methoden ein größerer Unterschied in den Lumina der Empfänger- und Spendergefäße (Ma und Wang, 2011). In der vorliegenden Untersuchung wurde das Modell der heterotop abdominalen Transplantation verwendet. Das Transplantat liegt bei dieser Transplantationsmethode dorsal im mittleren Abdomen. Es ist von den Bauchorganen, der Wirbelsäule und der Bauchdecke nach außen umgeben und entspricht einem ähnlich sicheren Umfeld wie im Thorax. Bei der zervikalen und femoralen Transplantationsmethode liegt das Organ unter der Haut und kann so durch eventuelle Einwirkungen von außen beeinflusst werden und hindert die Ratte stärker in ihrem physiologischen Bewegungsablauf. Das Transplantat ist im Versuchsaufbau der vorliegenden Studie deutlich durch die Bauchdecke zu palpieren und weist im Sinne der Kontrolle des Transplantatüberlebens keinen Nachteil gegenüber den anderen beiden Transplantationsmethoden vor.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigte sich mit dem Zeitpunkt der akuten Transplantatabstoßung, da chronische Transplantatabstoßungen sich erst im Langzeitverlauf nach Transplantation zeigen (Uretsky et al., 1987; Kobashigawa et al., 1995; Fellstrom et al., 1999).

3. Ergebnisse

3.1. Verträglichkeitsstudie

RNase A gehört zu den natürlich vorkommenden, endogenen Enzymen und weist die größte strukturelle Stabilität aller Säugerproteine auf (Dubos et al., 1937). Es wurde in mehreren tierexperimentellen Studien dargestellt, dass das Enzym RNase A dem Effekt von extrazellulärer RNA in kardiovaskulären Erkrankungen entgegenwirkt (Kannemeier et al., 2007; Gerriets et al., 2004; Rottger et al., 2005; Cabrera-Fuentes et al., 2014). In der hier vorliegenden Untersuchung wurden Ratten über 28 Tage mit intravenöser Applikation von RNase A in 2 verschiedenen Dosierungen im Vergleich zur Applikation von Kochsalzlösung alleine behandelt. Daraufhin wurden diese täglich klinisch untersucht. Nach Beendigung der 28 Tage wurden alle Organsysteme nach den Richtlinien der RITA (*Registry of Industrial Toxicology Animal-data*) histologisch untersucht (Kittel et al., 2004; Morawietz et al., 2004). Selbst eine zwanzigfach höhere Dosis als in der Literatur beschrieben (Walberer et al.; 2009) zeigte über einen Zeitraum von 4 Wochen bei Ratten keinerlei Gewebe- oder Organveränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe oder der niedriger angewendeten Dosis von RNase A. Klinisch zeigten alle unterschiedlich behandelten Gruppen keine Auffälligkeiten und nahmen gleichermaßen an Gewicht zu. Die Laboruntersuchungen von Blutproben aller behandelten Gruppen dieser Untersuchung lagen im Referenzbereich. Somit zeigte die Behandlung mit RNase A keinen Einfluss auf die Leukozytenanzahl, die Nierenwerte oder die Leberenzyme im Blut. RNase scheint zudem ein sicheres natürliches Protein darzustellen, da es als nicht toxisches Enzym agiert und durch den ubiquitär vorkommenden, hoch aktiven RNase-Inhibitor die Zerstörung von intrazellulärer RNA in allen Zelltypen verhindert wird (Dickson et al., 2005; Johnson et al., 2007). In der vorliegenden Studie entsteht bei intravenöser Applikation von RNase A über einen Zeitraum von 28 Tagen bei Ratten kein Schaden. Die Herzen der behandelten Ratten zeigten keinerlei Gewebeveränderung durch die Behandlung mit RNase A. Für einen längeren Zeitraum liegen für die intravenösen Applikation von RNase A bei Säugetieren derzeit keine Daten vor. Um eventuelle Langzeitschäden einer Therapie mit RNase A auszuschließen müsste dieser Versuchsaufbau über einen längeren Zeitraum ausgedehnt werden. Zudem ist die Anwendung bei anderen Säugetieren, außer der Maus, bisher noch nicht beschrieben (Kannemeier et al., 2007; Cabrera-Fuentes et al., 2014).

3.2. Transplantatüberleben

Das Transplantatüberleben in der Gruppe, die ausschließlich mit Kochsalzlösung behandelt wurde, lag bei $6,5 \pm 1,0$ Tagen. Dies entspricht bereits vorangegangenen Studien mit dem gleichen Transplantationsmodell (Zhu et al., 2013). In der vorliegenden Studie wurde das Transplantatüberleben mittels Palpation und bei unklarem Palpationsbefund zusätzlich mit Echokardiographie evaluiert (Tabelle A2). In einer ähnlichen Studie von Koizumi et al. wurde das Transplantatüberleben mittels Elektrokardiogramm (EKG) bestimmt. Durch diese noch sensiblere Methode zur Darstellung der Transplantatfunktion wurde hier ein finales Transplantatüberleben in der Kontrollgruppe von $8,5 \pm 1,8$ Tagen gemessen (Koizumi et al., 1996).

In der vorliegenden Untersuchung zur akuten Transplantatabstoßung führte die Behandlung mit aktiver pankreatischer RNase A zu einem signifikant längeren Transplantatüberleben von $10,5 \pm 1,8$ Tagen (log rank 11,0; $p = 0,001$). Auch die Behandlung mit aktiver rekombinanter humaner RNase 1 führte zu einem ähnlich verlängerten Transplantatüberleben von $11 \pm 0,3$ Tagen. Hingegen führte die Behandlung mit enzymatisch inaktiver humaner RNase 1 zu einem gleichermaßen ineffektiven Ergebnis wie jene mit Kochsalzlösung alleine ($8 \pm 0,5$ Tage; $p = 0,007$).

Die aktive RNase 1 ist in ihrer enzymatischen Aktivität vergleichbar mit jener von pankreatischer RNase A (Weickmann et al., 1981). Daher führten sowohl die Behandlung mit RNase A als auch die Behandlung mit aktiver humaner RNase 1 zu einem vergleichbar verlängerten Transplantatüberleben.

Diese Daten bestärken die Hypothese, dass RNase als mögliches Therapeutikum das Transplantatüberleben im heterotopen Transplantationsmodell verlängert, indem es extrazelluläre RNA degradiert und zerstört, da nur die Behandlung mit enzymatisch aktiven RNasen zu verlängerten Transplantatüberleben führten und die Behandlung mit inaktiver RNase keinen positiven Effekt auf das Transplantatüberleben zeigte.

3.3. Leukozyteninfiltration

Die akute zelluläre Abstoßung eines transplantierten Organs ist in erster Linie ein T-Zell-vermittelter Prozess, der mit Lymphozyten- und Makrophagen-Infiltration einhergeht (Lindenfeld et al., 2004). In der vorliegenden Studie ergaben quantitativ-stereologische Analysen geringere Volumendichten und geringere absolute Volumina besonders von T-Lymphozyten, aber auch B-Lymphozyten und Makrophagen im Myokard in der mit RNase A behandelten Gruppe nach Transplantation (siehe Publikation Tabelle 3). Das weist darauf hin, dass extrazelluläre RNA aus zerstörtem Gewebe zur Rekrutierung von Immunzellen führt. Solche mechanistischen Verbindungen wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits in Inflammationsmodellen (*in-vitro* und *in-vivo*) vor allem in Hinblick auf Monozyten beschrieben (Fischer et al., 2012). Allerdings müssen diese Verbindungen zwischen extrazellulärer RNA und Rekrutierung von Immunzellen für den Bereich der Herztransplantation noch im Detail erforscht werden.

In der Humanmedizin werden als postoperative Kontrolle des Abstoßungsgrades Herzmuskelbiopsate entnommen und nach den Richtlinien der ISHLT histologisch ausgewertet. Das Auftreten von Lymphozyten wird dabei nach Vorkommen von CD3⁺- und CD20⁺-Zellen (T- und B-Lymphozyten) bestimmt, die Gradierung erfolgt dabei semiquantitativ in keine, wenige, viele und zahlreiche Lymphozyten im perivaskulären oder interstitiellen Muskelgewebe (keine=0 Lymphozyten/Gesichtsfeld, wenige=1-4 Lymphozyten/Gesichtsfeld, viele=4-10 Lymphozyten/Gesichtsfeld, zahlreiche>10 Lymphozyten/Gesichtsfeld, bei 100x Vergrößerung). Zusammen mit dem klinischen Bild des Patienten wird der aktuelle Grad der Abstoßung definiert (Stewart et al., 2005; Berry et al. 2013).

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Transplantate am ersten und vierten postoperativen Tag in toto entnommen und der Grad der Leukozyteninfiltration mittels FACS-Analysen und quantitativ-stereologischen, bzw. quantitativ-morphologischen Auswertungen untersucht. Diese Analysen führten zu Zahlen mit denen statistisch gearbeitet werden kann und die somit einen genaueren Unterschied darstellen können als semiquantitative Gradeinteilungen.

Eine Veränderung in der klinischen Symptomatik war in der vorliegenden Studie bei den Versuchstieren nicht nachzuvollziehen, da es sich um ein heterotop abdominelles Transplantationsmodell handelt. Hierbei muss das Transplantat keine Funktionen des

thorakal gelegenen Herzens, wie Aufrechterhalten des Blutdruckes und der Blutversorgung der Organe, gewährleisten.

FACS-Analysen von verdautem Herzmuskelgewebe und quantitativ-stereologische Analysen von histologischen und immunhistologischen Präparaten finden in der Nachsorge von humanmedizinischen Herztransplantationen noch keine Anwendung. Diese sind in der Forschung umsetzbar, wie in dieser Untersuchung angewendet, allerdings für den klinischen Alltag und eine möglichst schnelle Therapieanpassung noch zu zeitaufwendig.

3.4. Ischämie-/Reperfusionsschaden

Ein weiterer wichtiger Punkt im Bereich der Transplantation sind Ischämie-/Reperfusionsschäden, welche in Verbindung mit Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in das Transplantat stehen (Fischer et al., 2012). Für Makrophagen ist beschrieben, dass sie einen Beitrag zum Ischämie-/Reperfusionsschaden bei solider Organtransplantation beitragen, indem sie Entzündungsmediatoren induzieren (Salehi und Reed, 2015). In der RNase A behandelten Gruppe zeigten sich, verglichen mit der Kontrollgruppe mittels FACS-Analysen von verdautem Herzmuskelgewebe, weniger neutrophile Granulozyten im Transplantat in der frühen Post-Transplantations-Phase. Zudem wurden niedrigere Makrophagenvolumina in den Herzen der mit RNase A behandelten Ratten durch quantitativ-stereologische Analysen an Tag 1 und 4 nach Transplantation gefunden (siehe Publikation Tabelle 2). Dies kann als Hinweis für einen reduzierten Ischämie-/Reperfusionsschaden gedeutet werden.

In der vorliegenden Studie wurde sich bewusst für ein allogenes Transplantationsmodell entschieden, um den Ischämie-/Reperfusionsschaden untersuchen zu können. In einem isogenen Versuchsaufbau ist keine Transplantatabstoßung zu erwarten und Bergmann und Kollegen zeigten in ihrer Studie, dass es auch zu keinem ausgeprägtem Ischämie-/Reperfusionsschaden kommt (Bergmann et al., 1982).

Zudem waren niedrigere Troponin I Spiegel im Blut der mit RNase A behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar, sowohl an Tag 1 nach Transplantation ($27,23 \pm 11,87$ lg/l versus $5,32 \pm 1,35$ lg/l; großer Effekt, $d_{Cohen} = 2,43$; 95% CI 0,51/3,81) als auch an Tag 4 nach Transplantation ($4,07 \pm 1,21$ lg/l versus $0,78 \pm 0,56$ lg/l; großer Effekt; $d_{Cohen} = 3,49$; 95% CI 0,54/5,03). Troponin I ist der primäre Biomarker für Herzschädigung in der Klinik (Amsterdam et al., 2014). Hohe Troponin I Spiegel im Plasma werden mit einem entstandenem Myokardschaden in Zusammenhang gebracht (Adams et al., 1993). Ischämie/Reperfusionsschäden führen zu Myokardschäden und können somit höhere Troponin I Spiegel erklären (Fyfe et al., 1996). Demnach deuten die niedrigeren Troponin I Spiegel in der mit RNase A behandelten Gruppe auf weniger Ischämie-/Reperfusionsschaden und weniger Myokardschaden hin. Ein Myokardschaden könnte in den ersten Tagen nach Transplantation durch akute Abstoßung entstehen. In einer anderen Studie konnte

allerdings der Zusammenhang zwischen höheren Troponin I Spiegeln und akuter Abstoßung nicht gezeigt werden (Dengler et al., 1998).

Diese Ergebnisse gleichen denen einer ähnlichen Studie, welche sich mit dem kardialen Ischämie-/Reperfusionsschaden bei Nagern befasste. Dabei zeigte sich das Zusammenspiel von extrazellulärer RNA und Tumornekrosefaktor α (TNF α) für das große Ausmaß an Myokardschaden und Infarktgröße verantwortlich, wohingegen die Behandlung mit RNase A zu einer signifikanten Verminderung dieser Läsionen führte (Cabrera-Fuentes et al., 2014).

Im Falle einer Organabstoßung nach Transplantation beschleunigt der Ischämie-/Reperfusionsschaden die Transplantatvaskulopathie, welche mit endothelialer Dysfunktion einhergeht (Valantine, 2003). Dieser endotheliale Schaden steht in Verbindung mit alloimmunen Antworten, wie akuter und chronischer Transplantatabstoßung und nicht alloimmunen Antworten, wie Organkonservierung, Ischämie-/Reperfusionsschaden, Inflammation, Infektion sowie auch Hyperlipidämie, Diabetes und Hypertension (Vassali et al., 2003).

Es gibt mehrere Überschneidungen in der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie und einer Atherosklerose (Guethoff et al., 2013). RNase wurde als neue Behandlung von Atherosklerose diskutiert (Simseyilmaz et al., 2014). Jedoch muss noch evaluiert werden, ob RNase auch eingesetzt werden kann, um im Langzeitverlauf einer TVP bei chronischer Transplantatabstoßung entgegenwirken zu können. Die vorliegende Studie befasst sich mit der akuten Transplantatabstoßung, die klassischerweise ohne immunsuppressive Therapie fünf bis sieben Tage nach Transplantation auftritt (Azuma et al., 1996; Billingham et al., 1985; Sibley, 1986).

3.5. Ödembildung und Thrombusformierung

Akutes und chronisches Transplantatversagen basieren auf einem kombinierten Prozess aus Infektion, Thrombusbildung, Endothelschaden und Ödembildung, welche in Verbindung mit dem Vorhandensein extrazellulärer RNA stehen, wie in mehreren vorangegangenen Studien bereits beschrieben wurde (Fischer et al., 2007; Fischer et al., 2012; Ghebrehiwet et al., 1983; Kannemeier et al., 2007). Dort wurde gezeigt, dass die Behandlung mit RNase extrazelluläre RNA beseitigt, welche als Kofaktor für Koagulationsproteine und Zytokine oder für Permeabilitätsfaktoren wie den *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGF- A) dient (Fischer et al.; 2007; Kannemeier et al., 2007; Walberer et al., 2009).

In der vorliegenden Untersuchung zur akuten Transplantatabstoßung wurde eine vergleichbare Wirkung nachgewiesen. RNase A-Therapie zeigte hier in quantitativ-stereologischen Untersuchungen von histologischen Proben eine reduzierte Volumendichte und ein geringeres absolutes Volumen von Ödem im Myokard sowohl an Tag 1 als auch an Tag 4 nach Transplantation. Am vierten postoperativem Tag führte die Behandlung mit RNase A zu einem reduziertem Ödemvolumen auf über die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem zeigte sich mittels Echokardiographie verminderte Thrombusformierung in den Transplantaten der mit RNase A behandelten Gruppe. Die reduzierte Ödem- und Thrombusbildung führte somit zu einem verlängerten Transplantatüberleben. Tatsächlich wurde die Expression von VEGF mit endothelialer Zellaktivierung und phänotypischen Veränderungen im Bereich der Mikrozirkulation von kardialen Allotransplantaten in Verbindung gebracht (Torry et al., 1995).

3.6. Gemischte Lymphozytenreaktion

Darüberhinaus zeigte RNase A in der vorliegenden Untersuchung eine immunsuppressive Wirkung. In der gemischten Lymphozytenreaktion wurde durch die Zugabe von RNase A die Proliferation von Effektor-T-Lymphozyten deutlich reduziert. Bereits in den sechziger Jahren wurde beschrieben, dass eine intraperitoneale Injektion einer aus Serum gewonnenen Alpha-2-Protein-Fraktion das Überleben von Homotransplantaten der Rattenhaut durch Verminderung von Antikörperbildung verlängerte (Mowbray, 1963). Es wurde nachgewiesen, dass diese verwendete Fraktion eine Ribonuklease enthielten, welche wahrscheinlich zeitweise die Antikörpersynthese unterdrückte (Mowbray und Hagrave 1966; Mowbray und Scholand, 1966). Der genaue Mechanismus dieser Wirkung von RNase A muss noch im Detail erforscht werden.

4. Schlussfolgerung

Die intravenöse Behandlung von Ratten mit RNase A nach heterotop abdomineller Herztransplantation führte in der vorliegenden Untersuchung im Vergleich zur Behandlung mit Kochsalzlösung alleine zu einem signifikant verlängertem Transplantatüberleben ($10,5 \pm 1,8$ vs. $6,5 \pm 1,0$; log-rank 11,0; $p = 0,001$).

Da auch die Behandlung mit aktiver humaner RNase zu einem verlängertem Transplantatüberleben führte, allerdings jene mit inaktiver humaner RNase nicht, basiert der zugrundeliegende Effekt höchstwahrscheinlich auf der Degradierung von extrazellulärer RNA.

In der frühen Phase nach Transplantation (Tag 1 und 4 nach OP) zeigten sich reduzierte Volumendichten und absolute Volumina von vor allem T- und B-Lymphozyten, aber auch Makrophagen im Herzmuskelgewebe in quantitativ-stereologischen Untersuchungen in den Herzen von Ratten die mit RNase A behandelt wurden. Auch FACS-Analysen von enzymatisch-verdautem Herzmuskelgewebe an Tag 1 und 4 nach Transplantation zeigten eine verminderte Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Leukozyten in der mit RNase A behandelten Gruppe. Somit hat RNase einen reduzierenden Effekt auf die Einwanderung von Immunzellen in das Myokard. Die immunmodellierende Komponente von RNase wird zudem in der gemischten Lymphozytenreaktion (*in vitro*) sichtbar, da die Zugabe von RNase A die Effektor-T-Lymphozyten deutlich reduzierte.

Auch die Ödembildung nach Transplantation konnte durch Behandlung mit RNase A minimiert werden, wie durch quantitativ-stereologische Analysen nachgewiesen wurde. Mittels Echokardiographie stellte sich weniger intraventrikuläre Thrombusbildung in den mit RNase behandelten Gruppen dar.

Die Kombination aus verminderter Leukozyteninfiltration in das Myokard und reduzierter Ödem- und Thrombusbildung verzögerte somit die Transplantatabstoßung und führte in der vorliegenden Untersuchung zu verlängertem Transplantatüberleben durch Behandlung mit RNase.

RNase scheint ein sicheres und erfolgsversprechendes Therapeutikum für die Herztransplantationsmedizin darzustellen, zudem kann RNase extrem hohe Temperaturen aushalten und somit für intravenöse Applikationszwecke durch thermische Einwirkung sterilisiert werden (Dubos et al., 1937).

Um den Effekt von RNase als Zusatz zu einer klassischen immunsuppressiven Therapie zu evaluieren, müsste eine weitere Studie mit immunsuppressiver und zusätzlicher RNase-Therapie durchgeführt werden. Das mittlere Transplantatüberleben bei Ratten, welche mit Cyclosporin A behandelt wurden, lag bei Takami et al. (1995) zum Beispiel bei 32 Tagen. RNase könnte in solch einem Versuchsaufbau durch seine aufgezeigten kardioprotektiven Wirkungen einen zusätzlichen Nutzen zu der Cyclosporin-A-Behandlung für das Transplantatüberleben bieten. Hierbei könnte untersucht werden, ob RNase auch eingesetzt werden kann, um im Langzeitverlauf einer TVP bei chronischer Transplantatabstoßung entgegenzuwirken. Zudem können parallel Daten gesammelt werden, ob eine langfristige Behandlung mit RNase A von den Versuchstieren gut toleriert wird und keine toxischen Nebenwirkungen hervorruft.

Es ist momentan noch zu früh, die beschriebenen Wirkungen mit der kardioprotektiven Funktion von RNase in Verbindung zu bringen. Allerdings zeigt das aktuelle experimentelle Modell neue Einblicke in die Möglichkeit, Ribonuklease als Therapeutikum einzusetzen, um das Transplantatüberleben zu verbessern und erlaubt den zugrunde liegenden Mechanismus mehr im Detail zu entschlüsseln.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Im Bereich der Herztransplantation stellt die Transplantatabstoßung eine der gravierendsten Komplikationen dar (Lund et al., 2014).

In der vorliegenden Untersuchung soll dargestellt werden, ob die intravenöse Applikation von RNase das Transplantatüberleben im heterotop abdominellen Herztransplantationsmodell an Ratten verlängern kann. In vorangegangenen *In-vivo*-Studien an Mäusen und Ratten zeigte die Applikation von RNase ein vermindertes Einwandern von Leukozyten in das umliegende Gewebe von Gefäßen, reduzierte die Gefäßpermeabilität und Ödembildung und führte zu geringerer Thrombusbildung (Cabrera-Fuentes et al., 2014; Gerriets et al., 2004; Kannemeier et al., 2007; Rottger et al., 2005).

Gewebe- und Gefäßschäden stehen in Zusammenhang mit der Freisetzung von intrazellulären Komponenten wie Ribonukleinsäure (RNA), welche inflammatorische Prozesse und Thrombose antreiben (Fischer et al., 2007; Fischer et al., 2012; Kannemeier et al., 2007). Basierend auf der in diesem Zusammenhang entgegenwirkenden anti-inflammatorischen und kardioprotektiven Funktion von Ribonuklease A (RNase A), wurde deren Rolle in einem experimentellen Herztransplantationsmodell untersucht.

Herzen von Inzucht-Brown-Norway-Ratten wurden heterotop in das Abdomen von Inzucht-Lewis-Ratten transplantiert. Die Empfängertiere wurden 30 Minuten vor OP und danach jeden zweiten Tag intravenös mit Kochsalzlösung oder boviner pankreatischer RNase A (50µg/kg) behandelt und die Transplantatfunktion täglich mittels transabdomineller Palpation und Echokardiographie evaluiert.

Die Behandlung der Ratten mit RNase A führte zu einem signifikant verlängerten Transplantatüberleben von $10,5 \pm 1,8$ Tagen im Vergleich zu $6,5 \pm 1,0$ Tagen bei Behandlung mit Kochsalzlösung alleine (log-rank 11,0; $p = 0,001$).

Auch die im weiteren Versuchsaufbau untersuchte Behandlung mit aktiver humaner RNase 1 verlängerte das Transplantatüberleben ähnlich ($11,0 \pm 0,3$ Tage), wobei die Behandlung mit inaktiver humaner RNase 1 dies nicht vermochte ($8 \pm 0,5$ Tage, $p = 0,007$). Dies spricht dafür, dass die Degradierung von extrazellulärer RNA von zentraler Rolle ist.

Über einen Zeitraum von 28 Tagen konnten keine toxischen Nebenwirkungen durch die Behandlung mit RNase A nachgewiesen werden. RNase scheint zudem ein sicheres natürliches Protein darzustellen, da es als nicht toxisches Enzym agiert und durch den ubiquitär vorkommenden, hoch aktiven RNase-Inhibitor die Zerstörung von intrazellulärer RNA in allen Zelltypen verhindert wird (Dickson et al., 2005; Johnson et al., 2007).

Analysen von enzymatisch-verdaulichem Herzmuskelgewebe mittels FACS und quantitativ-stereologische Untersuchungen von Transplantaten an Tag 1 und 4 *post transplantationem* zeigten geringere Leukozyteninfiltration in das Herzmuskelgewebe und zudem reduzierte Ödembildung bei RNase A behandelten Ratten. Mittels Echokardiographie stellte sich weniger intraventrikuläre Thrombusbildung in den mit RNase behandelten Gruppen dar. Somit führte die Behandlung mit RNase zu verzögerter Transplantatabstoßung und dadurch zu verlängertem Transplantatüberleben.

Des Weiteren führte RNase A bei der gemischten Lymphozytenreaktion (*in vitro*) zu reduzierter Proliferation von Effektor-T-Lymphozyten, welches auf eine immunsuppressive Wirkung des Enzyms schließen lässt.

Im Bereich der Herztransplantation scheint RNase A ein sicheres und vielversprechendes Adjuvans darzustellen, welches Ischämie-/Reperfusionsschaden und Transplantatabstoßung entgegenwirkt, indem es extrazelluläre RNA degradiert.

VII. SUMMARY

Graft rejection is one of the major complications after heart transplantation (Lund et al., 2014).

The present study evaluated efficiency of ribonuclease A (RNase A) to prolong graft survival in a rodent heart transplantation model.

Previous murine *in vivo* studies showed that treatment with RNase A leads to reduced leukocyte recruitment and transmigration into perivascular tissue, decreases vessel permeability and edema formation and additionally lowers thrombus formation (Cabrera-Fuentes et al., 2014; Gerriets et al., 2004; Kannemeier et al., 2007; Rottger et al., 2005).

Cell damage, along with tissue and vascular injury are associated with the exposure and release of intracellular components like ribonucleic acids (RNA), which promote inflammatory reactions and thrombosis (Fischer et al., 2007; Fischer et al., 2012; Kannemeier et al., 2007). Based on the counteracting anti-inflammatory and cardio-protective functions of RNase A in this context, its role in an experimental model of heart transplantation in rats was studied.

Inbred Brown Norway rat cardiac allografts were heterotopically transplanted into the abdomen of inbred Lewis rats. Recipients were intravenously (IV) treated 30 minutes prior to surgery and every other day with saline or bovine pancreatic RNase A (50µg/kg). Transplant function was evaluated via transabdominal palpation and echocardiography.

RNase A treatment of rats resulted in prolonged graft survival up to 10.5±1.8 days compared to 6.5±1.0 days in saline treatment (log-rank 11.0, $p = 0.001$).

Treatment of rats with (recombinant) human pancreatic RNase 1 prolonged graft survival similarly, unlike treatment with (recombinant) inactive human RNase 1 (each 50µg/kg IV every other day, 11.0±0.3 days vs 8±0.5 days, $p = 0.007$). This shows that degradation of RNA plays a central role in this context.

Intravenous application of RNase A showed no toxic side effects. RNase seems to be a safe natural enzyme, it acts as a non-toxic protein and degradation of intracellular RNA is prevented by a highly active RNase inhibitor (Dickson et al., 2005; Johnson et al., 2007).

Heart tissue flow cytometry and quantitative stereological analyses of explanted hearts at postoperative day (POD) 1 or POD 4 showed reduced leukocyte infiltration and edema formation in RNase A treated rats. Less intraventricular thrombus formation was found through echocardiography in the RNase treated groups. These mechanisms of RNase led to delayed graft rejection and prolonged graft survival.

In allogeneic mixed lymphocyte reactions, RNase A decreased the proliferation of effector T cells, this shows an immunosuppressive effect of the enzyme.

Upon heart transplantation, RNase administration appears to present a promising and safe adjuvant to counteract ischemia/reperfusion injury and graft rejection, by degrading RNA.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbott CP, Lindsey ES, Creech O Jr, Dewitt CW. 1964. A technique for heart transplantation in the rat. *Archive of Surgery*. 89:645-652.

Adams J, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez J, Apple F, Ladenson J, Jaffe A. 1993. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation*. 88:101-106.

Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE, Jr., Ganiats TG, Holmes DR, Jr., Jaffe AS, Jneid H, Kelly RF, Kontos MC, Levine GN, Liebson PR, Mukherjee D, Peterson ED, Sabatine MS, Smalling RW, Zieman SJ. 2014. 2014 aha/acc guideline for the management of patients with non-st-elevation acute coronary syndromes: Executive summary: A report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines. *Circulation*. 130:2354-2394.

Azuma H, Paul LC, and Tilney NL. 1996. Insights into acute and chronic rejection. *Transplantation Proceedings*. 28:2081-2084.

Barnard CN. 1967. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *South African Medical Journal*. 41:1271-1274.

Beintema JJ, Wietzes P, Weickmann JL, Glitz DG. 1984. The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease. *Analytical Biochemistry*. 136:48-64.

Bergmann SR, Lerch RA, Carlson EM, Saffitz JE, Sobel BE. 1982. Detection of cardiac transplant rejection with radiolabeled lymphocytes. *Circulation*. 65:591-599.

Billingham ME, Cary NR, Hammond ME, Kemnitz J, Marboe C, McCallister HA, Snovar DC, Winters GL, Zerbe A. 1990. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart rejection study group. The international society for heart transplantation. *Journal of Heart Transplantation*. 9:587-593.

Billingham ME. 1985. Endomyocardial biopsy detection of acute rejection in cardiac allograft recipients. *Heart and Vessels Suppl.* 1:86-90.

Billingham ME, Caves PK., Dong E Jr., Shumway NE. 1973. The diagnosis of canine orthotopic cardiac allograft rejection by transvenous endomyocardial biopsy. *Transplantation Proceedings.* 5:741-743.

Borel J, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. 1976. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions.* 6:468-475.

Cabrera-Fuentes HA, Ruiz-Meana M, Simseyilmaz S, Kostin S, Inerte J, Saffarzadeh M, Galuska SP, Vijayan V, Barba I, Barreto G, Fischer S, Lochnit G, Ilinskaya ON, Baumgart-Vogt E, Boning A, Lecour S, Hausenloy DJ, Liehn EA, Garcia-Dorado D, Schluter KD, Preissner KT. 2014. Rnase1 prevents the damaging interplay between extracellular rna and tumour necrosis factor-alpha in cardiac ischaemia/reperfusion injury. *Thrombosis and Haemostasis.* 112:1110-1119.

Carrel A, Guthrie CC. 1905. The transplantation of veins and organs. *American Journal of Medicine.* 10:1101-1102.

Cass MH, Brock R. 1959. Heart excision and replacement. *Guy's Hospital Reports.* 108:285-290.

Caves PK, Stinson EB, Billingham ME, Rider AK, Shumway NE. 1973. Diagnosis of human cardiac allograft rejection by serial cardiac biopsy. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 66:461-466.

Caves PK, Stinson EB, Billingham ME, Shumway NE. 1974. Serial transvenous biopsy of the transplanted human heart. Improved management of acute rejection episodes. *Lancet.* 1:821-826.

Chapman JR. 1986. Hyperacute rejection of a renal allograft in the presence of anti-HLA-Cw5 antibody. *Transplantation.* 42:91-93.

Cohen J. 1988. PowerAnalysis for the Behavioral Science. Hillsdale, NJ: Erlbaum 2nd. ed.

Cooley DA, Bloodwell RD, Hallman GL, Nora JJ, Harrison GM, Leachman RD. 1969. Organ transplantation for advanced cardiopulmonary disease. Annals of Thoracic Surgery. 8:30-46.

Costanzo MR et al., 2010. The International Society of Heart and Lung Transplantation, Guidelines for the care of heart transplant recipients. Journal of Heart and Lung Transplantation. 29:914-956.

Dengler TJ, Zimmermann R, Braun K, Müller-Bardorff M, Zehelein J, Sack F-U, Schnabel PA, Kübler W, Katus HA. 1998. Elevated serum concentrations of cardiac troponin T in acute allograft rejection after human heart transplantation. Journal of the American College of Cardiology. 32: 405-12.

Demikhov, V.P. 1962. Experimental transplantation of vital organs. Consultants' Bureau, New York.

Deutsche Gesellschaft Organtransplantation (DSO). 2016. Herztransplantation. <https://www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation/herztransplantation.html>. Stand 12.07.2017.

Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. 2005. Ribonuclease inhibitor: Structure and function. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 80:349-374.

Downie HG. 1953. Homotransplantation of the dog heart. AMA. Archive of Surgery. 66:624-636.

Dubos RJ. 1937. The decomposition of yeast nucleic acid by a heat resistant enzyme. Science. 85:549-550.

Eifert S, Kofler S, Nickel T, Horster S, Bigdeli AK, Beiras-Fernandez A, Meiser B, Kaczmarek I. 2012. Gender-based analysis of outcome after heart transplantation. Experimental and Clinical Transplantation. 10:368-374.

Fellstrom B, Backman U, Larsson E, Zezina L. 1999. Immunologic and nonimmunologic risk factors of chronic rejection. *Transplantation Proceedings*. 31:1304-1305.

Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, Zheleva K, Hocke A, Hippenstiel S, Preissner KT. 2007. Extracellular rna mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood*. 110:2457-2465.

Fischer S, Grantzow T, Pagel JI, Tschernatsch M, Sperandio M, Preissner KT, Deindl E. 2012. Extracellular rna promotes leukocyte recruitment in the vascular system by mobilising proinflammatory cytokines. *Thrombosis and Haemostasis*. 198:730-741.

Fischer S, Preissner KT. 2013. Extracellular nucleic acids as novel alarm signals in the vascular system. *Mediators of defence and disease. Hamostaseologie*. 33:37-42.

Fischer S, Nishio M, Dadkhahi S, Gansler J, Saffarzadeh M, Shibamiyama A, Kral N, Baal N, Koyama T, Deindl E, Preissner KT. 2011. Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis*. 105:345-355.

Fyfe B, Loh E, Winters GL, Couper GS, Kartashov AI, Schoen FJ. 1996. Hearttransplantation-associated perioperative ischemic myocardial injury morphological features and clinical significance. *Circulation*. 93: 1133-1140.

Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. 2004. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*. 35:566-571.

Ghebrehiwet B, Randazzo BP, Dunn JT, Silverberg M, Kaplan AP. 1983. Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *Journal of Clinical Investigation*. 71:1450-1456.

Gibbon JH. 1954. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minnesota Medicine*. 37:171-180.

Golberg M, Berman EF, Akman LC. 1958. Homologous transplantation of the canine heart. *Journal of the International College of Surgeons*. 30:575-586.

Gordon CR, Matthews MS, Lefebvre DR, Strande LF, Marra SW, Guglielmi M, Hollenberg SM, Hewitt CW. 2007. A new modified technique for heterotopic femoral heart transplantation in rats. *Journal of Surgical Research*. 139:157-163.

Guethoff S, Grinninger C, Kaczmarek I. 2013. Everolimus: Sidekick against atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 231:27-28.

Hardy JD, Kurrus FD, Chavez CM, Neely WA, Eraslan S, Turner MD, Fabian LW, Labecki TD. 1964. Heart transplantation in man: Developmental studies and report of a case. *Journal of the American Medical Association*. 188:1132-1140.

Jabbour A, Macdonald P. 2015. Latest Developments in Heart Transplantation: A Review. *Clinical Therapeutics*. 37:2234-2241.

Johnson RJ, McCoy JG, Bingman CA, Phillips GN, Jr., Raines RT. 2007. Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein. *Journal of Molecular Biology*. 368:434-449.

Jordan SC. 1988. Hyperacute allograft rejection mediated by anti-vascular endothelial cell antibodies with a negative monocyte crossmatch. *Transplantation*. 46:585-587.

Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl ML, Sedding D, Massberg S, Gunther A, Engelmann B, Preissner KT. 2007. Extracellular rna constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:6388-6393.

Kartha G, Bello J, Harker D. 1967. Tertiary Structure of Ribonuclease. *Nature*.

213:862–865.

Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. 1987. A novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *Journal of Antibiotics*. 40:1249-1255.

Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, Klapwijk J, Elwell MR, Lenz B, O'Sullivan MG, Roth DR, Wadsworth PF. 2004. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 55:413-431.

Koizumi H, Konoeda Y, Kobayashi S, Koizumi H, Tamaki T, Tanioka Y. 1996. Comparison of Methods to Evaluate Acute Rejection in Heterotopic Heart Transplantation in Rats. *Experimental Animals*. 45:217-225.

Kobashigawa JA, Miller L, Yeung A, Hauptman P, Ventura H, Wilensky R, Valantine H, Wiedermann J. 1995. Does acute rejection correlate with the development of transplant coronary artery disease? A multicenter study using intravascular ultrasound. Sandoz/CVIS Investigators. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 14:221-226.

Kobashigawa J, Patel J, Azarbal B, Kittleson M, Chang D, Czer L, Daun T, Luu M, Trento A, Cheng R, Esmailian F. 2015. Randomized pilot trial of gene expression profiling versus heart biopsy in the first year after heart transplant: early invasive monitoring attenuation through gene expression trial. *Circulation: Heart Failure*. 8:557-564.

Kunitz M. 1939. Isolation from beef pancreas of a crystalline protein possessing ribonuclease activity. *Science*. 90:112-113.

Kunitz M. 1940. Crystalline ribonuclease. *Journal of General Physiology*. 24:15-32.

Landre JB, Hewett PW, Olivot JM, Friedl P, Ko Y, Sachinidis A, Moenner M. 2002. Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (rnase 1). *Journal of Cellular Biochemistry*. 86:540-552.

Lindenfeld J, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, Mestroni L, Page RL, Kobashigawa J. 2004. Drug therapy in the heart transplant recipient: Part I: Cardiac rejection and immunosuppressive drugs. *Circulation*. 110:3734-3740.

Lower RR, Shumway NE. 1965. Long-term survival of cardiac homografts. *Surgery*. 58:110-119.

Lower RR, Shumway NE. 1960. Studies on orthotopic homotransplantation of the canine heart. *Surgical Forum*. 11:18-19.

Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, Dobbels F, Goldfarb SB, Levvey BJ, Meiser B, Yusef RD, Stehlik J. 2014. The registry of the international society for heart and lung transplantation: Thirty-first official adult heart transplant report--2014; focus theme: Retransplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 33:996-1008.

Ma Y, Wang G. 2011. Comparison of 2 heterotopic heart transplant techniques in rats: cervical and abdominal heart. *Experimental and Clinical Transplantation*. 9:128-133.

Mann FC, Priestley JT, Markowitz J, Yater WM. 1933. Transplantation of the intact mammalian heart. *Archives of Surgery*. 26:219-224.

Marcus E, Wong SNT, Luisada AA. 1951. Homologous heart grafts: Transplantation of the heart in dogs. *Surgical Forum*. 212-217.

Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Bube A, Keane K, Halm S, Heuser A, Hellmann J. 2004. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 55:433-449.

Mowbray JF, Hargrave DC. 1966. Further studies on the preparation of the immunosuppressive alpha-2 protein fraction from the serum and its assay in mice. *Immunology*. 11:413-419.

Mowbray JF, Scholand J. 1966. Inhibition of antibody production by ribonucleases. *Immunology*. 11:421-426.

Mowbray JF. 1963. Effect of large doses of an alpha2-glycoprotein fraction on the survival of rat skin homografts. *Transplantation*. 1:15-20.

Nakagawa S, Cuthill IC. 2007. Effect size, confidence interval and statistical significance, a practical guide for biologists. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*.82:591-605.

Ono K, Lindsey ES. 1969. Improved technique of heart transplantation in rats. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 57:225-229.

Oyer PE, Stinson EB, Jamieson SW. 1982. One year experience with Cyclosporin A in clinical heart transplantation. *Heart Transplant*. 4:285-290.

Patel JK, Kittleson M, Kobashigawa JA. 2011. Cardiac allograft rejection. *Surgeon*. 9: 160-167.

Platt JL, Bach FH. 1991. The barrier to xenotransplantation. *Transplantation*. 52:937-947.

Platt JL. 1991. Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation*. 52:214-220.

Roig E, Almenar L, Crespo-Leiro M, Segovia J, Mirabet S, Delgado J, Pérez-Villa F, Luís Lambert J, Teresa Blasco M, Muñoz J. 2015. Heart transplantation using allografts from older donors: Multicenter study results. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 52:214-220.

Rottger C, Bachmann G, Gerriets T, Kaps M, Kuchelmeister K, Schachenmayr W, Walberer M, Wessels T, Stolz E. 2005. A new model of reversible sinus sagittalis superior thrombosis in the rat: Magnetic resonance imaging changes. *Neurosurgery*. 57:573-580.

Ruehl-Fehlert, Kittel B, Morawietz G, Deslex P, Keenan C, Mahrt CR, Nolte T, Robinson M, Stuart BP, Deschl U. 2003. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 55:91-106.

Salehi S, Reed EF. 2015. The divergent roles of macrophages in solid organ transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 20:446-453.

Scheidt WV, Erdmann E, Beuckelmann DJ., Böhm M, Hanrath P, Meyer J. 2000. Herztransplantation. In: "Klinische Kardiologie", Steinbeck, G. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 5:1338-1373.

Schein CH. 1997. From housekeeper to microsurgeon: The diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases. *Nature biotechnology*. 15:529-536.

Schmid FX, Hengstenberg C, Völkel S, Birnbaum D. 2004. Chirurgische Therapieoptionen bei schwerer Herzinsuffizienz. *Deutsches Aerzteblatt*. 101:429-435.

Sibley RK. 1986. Endomyocardial biopsy in the cardiac allograft recipient. A review of 570 biopsies. *Annals of Surgery*. 203:177-187.

Simsekylmaz S, Cabrera-Fuentes HA, Meiler S, Kostin S, Baumer Y, Liehn EA, Weber C, Boisvert WA, Preissner KT, Zerneck A. 2014. Role of extracellular rna in atherosclerotic plaque formation in mice. *Circulation*. 129:598-606.

Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Marboe CC, McManus B, Reed EF, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose AG, Rose M, Suci-Focia N, Zeevi A, Billingham ME. 2005. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 24:1710-1720.

Takami H, Backer CL, Crawford SE, Zales VR, Mavroudis C. 1995. Influence of gender on allograft rejection in a rat heart transplant model. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 14:529-536.

Torry RJ, Labarrere CA, Torry DS, Holt VJ, Faulk WP. 1995. Vascular endothelial growth factor expression in transplanted human hearts. *Transplantation*. 60:1451-1457.

Uretsky BF, Murali S, Reddy PS, Rabin B, Lee A, Griffith BP, Hardesty RL, Trento A, Bahnson HT. 1987. Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone. *Circulation*. 76:827-834.

Valantine HA. 2003. Cardiac allograft vasculopathy: Central role of endothelial injury leading to transplant "atheroma". *Transplantation*. 76:891-899.

Vassalli G, Gallino A, Weis M, von Scheidt W, Kappenberger L, von Segesser LK, Goy JJ. 2003. Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *European Heart Journal*. 24:1180-1188.

Walberer M, Tschernatsch M, Fischer S, Ritschel N, Volk K, Friedrich C, Bachmann G, Mueller C, Kaps M, Nedelmann M, Blaes F, Preissner KT, Gerriets T. 2009. Rnase therapy assessed by magnetic resonance imaging reduces cerebral edema and infarction size in acute stroke. *Current Neurovascular Research*. 6:12-19.

Webb WR, Howard HS, Neely WA. 1959. Practical methods of homologous cardiac transplantation. *Journal of Thoracic Surgery*. 37:361-366.

Weickmann JL, Elson M, Glitz DG. 1981. Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease. *Biochemistry*. 20:1272-1278.

Weis M, Von Scheidt W. 1997. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation*. 96:2069-2077.

Wieczorek AJ, Rhyner C, Block LH. 1985. Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82:3455-3459.

Yokota K, Takishima T, Sato K. 1989. Comparative studies of FK 506 and

Cyclosporin in canine orthotopic allograft survival. *Transplantation Proceedings*. 21:1066-1068.

Zenker R, Klinner W, Sebening F. 1969. Betrachtungen zur Transplantation des Herzens. *Langenbecks Archive für Chirurgie*. 326:1-4.

Zhu J, Chen S, Wang J. 2013. Splenectomy increases the survival time of heart allograft via developing immune tolerance.. *Journal of Cardiothoracic Surgery*. 129:1749-8090.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Wirkmechanismen von extrazellulärer RNA (eRNA) und Ansatzpunkt von RNase A im Transplantationsmodell.....	2
Abbildung 2. Schematische Darstellung der Auswirkungen von extrazellulärer RNA.....	12
Abbildung 3. Methode der heterotop abdominellen Herztransplantation.....	14
Abbildung 4. Zeitlichen Abfolge (d=Tage) nach Herztransplantation.....	15

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle A1. Evaluationstabelle zur Transplantatfunktion nach Gordon et al. 2007.....	61
--	----

3. Anhangstabelle

Tabelle A1. Evaluationstabelle zur Transplantatfunktion nach Gordon et al. 2007

Heartbeat strength score nach Gordon et al. 2007					
Postoperative Day					
Morgens					
Transplantatfunktion	(-)	(+)	(++)	(+++)	Nicht beurteilbar
Per Palpation					
Per Echokardiographie					
Abends					
Transplantatfunktion	(-)	(+)	(++)	(+++)	Nicht beurteilbar
Per Palpation					
Per Echokardiographie					
(-) no beat, (+) very weak beat, (++) strong beat, (+++) very strong beat					

X. PUBLIKATIONSLISTE

Chillo O, Kleinert EC, Lautz T, Lasch M, Pagel JI, Heun Y, Troidl K, Fischer S4, Caballero-Martinez A, Mauer A, Kurz AR, Assmann G, Rehberg M, Kanse SM, Nieswandt B, Walzog B, Reichel CA, Mannell H, Preissner KT, Deindl E. 2016. Perivascular Mast Cells Govern Shear Stress-Induced Arteriogenesis by Orchestrating Leukocyte Function. *Cell Reports*. 16:2197-2207

Kleinert E, Langenmayer MC, Reichart B, Kindermann J, Griemert B, Blutke A, Troidl K, Mayr T, Grantzow T, Noyan F, Abicht JM, Fischer S, Preissner KT, Wanke R, Deindl E, Guethoff S. 2016. Ribonuclease (RNase) Prolongs Survival of Grafts in Experimental Heart Transplantation. *Journal of American Heart Association*. 5:1-13

Fey T, Schubert KM, Schneider H, Fein E, Kleinert E, Pohl U, Dendorfer A. 2016. Impaired endothelial shear stress induces podosome assembly via VEGF up-regulation. *The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 30:2755-2766

Guethoff S, Stroeh K, Grinninger C, Koenig MA, Kleinert EC, Rieger A, Mayr T, von Ziegler F, Reichart B, Hagl C, Schramm R, Kaczmarek I, Meiser BM. 2015. De novo sirolimus with low-dose tacrolimus versus full-dose tacrolimus with mycophenolate mofetil after heart transplantation--8-year results. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 34:634-642

Chandraratne S, von Bruehl ML, Pagel JI, Stark K, Kleinert E, Konrad I, Farschtschi S, Coletti R, Gärtner F, Chillo O, Legate KR, Lorenz M, Rutkowski S, Caballero-Martinez A, Starke R, Tirniceriu A, Pauleikhoff L, Fischer S, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Ware J, Nieswandt B, Schaper W, Schulz C, Deindl E, Massberg S. 2015. Critical role of platelet glycoprotein $\text{Ib}\alpha$ in arterial remodeling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 35:589-597

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Berlin Symposium für Xenotransplantation 2015 in Venedig vorgestellt und mit einem Posterpreis ausgezeichnet:

Kleinert EC, Guethoff S, Mayr T, Abicht JM, Langenmayer M, Wanke R, Reichart B, Deindl E. RNase A in Transplantation.

XI. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Rüdiger Wanke, für seine wissenschaftliche Unterstützung während der gesamten Zeit der Dissertation.

Weiterhin geht mein Dank an meine externe Betreuerin PD Dr. Elisabeth Deindl, die mir die Anfertigung meiner Dissertation ermöglicht hat und mich immer bestens gefördert hat.

Zudem geht mein ganz persönlicher Dank an Dr. Sonja Güthoff, promovierte Mitbetreuerin der Dissertation aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München, die mich sehr zuverlässig und vertrauensvoll, auch über die Zeit der Dissertation hinweg, unterstützt und begleitet hat.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bruno Reichart möchte ich für sein Engagement und die Wissensvermittlung danken, es war immer eine sehr tolle Zusammenarbeit.

Darüber hinaus möchte ich meinen Teamkollegen am Walter-Brendel-Zentrum danken. Insbesondere möchte ich mich in diesem Rahmen bei meinen Kolleginnen Dr. Jana Brandstetter, Dr. Martina Ascher und Amelia Caballero Martinez für die schöne gemeinsame Doktorandenzeit bedanken.

Dem Team der tiermedizinischen Pathologie möchte ich herzlich danken, ich wurde vor allem von Dr. Martin Langenmayer, PD Dr. Andreas Parzefall und Dr. Daniela Emrich sehr gut aufgenommen und hervorragend betreut. Zudem möchte ich mich bei Michaela und Doris für die tolle Einführung im Paraffinlabor bedanken!

Besonders herzlichen Dank auch an meine Freunde Dr. Lisa Günther, Nina Bantschow, Dr. Sarah Lettmann und Sophie Strobel für ihre Unterstützung und den Ausgleich über all die Jahre hinweg.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, ganz speziell meinen Eltern, die mir immer zur Seite stehen und mich voll unterstützen. Danke auch an meine beiden Geschwister, ohne die ich sicher nicht derselbe wäre.

Meinem Freund Max danke ich ganz besonders für seine Motivation und Hilfe.

All diese besonderen Menschen haben dazu beigetragen, dass ich diese Dissertation schreiben und vollenden konnte, vielen Dank dafür!

Diese Arbeit ist in Kooperation mit dem Transregio Sonderforschungsbereich 127 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) durchgeführt worden, für deren finanzielle Unterstützung ich mich bedanke.

Zudem wurde meine Arbeit durch die Fritz-Bender-Stiftung finanziert, herzlichen Dank dafür.