

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede
Abteilung für Molekulare Onkoimmunologie
Leiterin: Frau Professor Dr. rer. nat. A. M. Waaga-Gasser

**Untersuchungen zum immunologischen Monitoring chronischer Abstoßung
bei nierentransplantierten Patienten
unter unterschiedlichen immunsuppressiven Protokollen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Igor Tsauro
aus Podolsk, Russland

Würzburg, April 2006

Referentin: Professor Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

Koreferent: Professor Dr. med. C. Wanner

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 12/06/07

Der Promovend ist Arzt

Meinem Grossvater gewidmet....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Fragestellung	9
3. Material und Methoden	10
3.1. Patienten	10
3.1.1. Auswahlkriterien	10
3.1.2. Immunsuppressive Behandlungsgruppen	10
3.2. Untersuchte Zellen	11
3.2.1. Gewinnung der mononuklären Zellen	11
3.2.2. Verwendete Peptide	11
3.2.3. Antigenpräsentierende Zellen (APC)	11
3.2.4. Etablierung der Zelllinien	11
3.3. Untersuchungsmethoden	13
3.3.1. ELISPOT	13
3.3.2. ELISA	14
3.3.3. Luminex	16
3.3.4. Proliferationsassay	17
3.3.5. FACS	18
3.3.6. Immunfluoreszenz und Cytospins	19
3.3.7. RT-PCR	20
3.3.8. Real-time RT-PCR	21
4. Ergebnisse	23
4.1. Patienten	23
4.2. Charakterisierung der Zytokinexpression der T-Zelllinien im ELISPOT	23
4.2.1. Immunsuppression mit CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1A und 1B)	23
4.2.2. Immunsuppression mit Tacrolimus, MMF und Prednisolon	25

(Gruppe 2A und 2B)	
4.2.3. Immunsuppression mit CsA und Prednisolon	27
(Gruppe 3A und 3B)	
4.3. Charakterisierung der T-Zelllinien im ELISA	29
4.3.1. Immunsuppression mit CsA, MMF und Prednisolon	29
(Gruppe 1A und 1B)	
4.3.2. Immunsuppression mit Tacrolimus, MMF und Prednisolon	31
(Gruppe 2A und 2B)	
4.3.3. Immunsuppression mit CsA und Prednisolon	32
(Gruppe 3A und 3B)	
4.4. Charakterisierung der T-Zelllinien mit Luminex	33
4.5. Analyse der Teilungsaktivität der T-Zelllinien im Proliferationsassay	34
4.5.1. Immunsuppression mit CsA, MMF und Prednisolon	34
(Gruppe 1A und 1B)	
4.5.2. Immunsuppression mit Tacrolimus, MMF und Prednisolon	36
(Gruppe 2A und 2B)	
4.5.3. Immunsuppression mit CsA und Prednisolon (Gruppe 3A und 3B)	37
4.6. Charakterisierung des T-Zelltyps der T-Zelllinien	39
4.6.1. CD3+CD8+ Markierung	39
4.6.2. CD3+CD4+ Markierung	40
4.6.3 CD4+CD25+ Markierung	41
4.7. Charakterisierung des T-Zelltyps mittels Immunfluoreszenz (Cytospins)	43
4.7.1. CD4+CD8+ Färbung	43
4.7.2. CD4+CD25+ Markierung	45
4.8. Analyse der Genexpression der T-Zelllinien	47
4.9. Zusammenfassung der Ergebnisse	47
5. Diskussion	
5.1. Klinische immunsuppressive Protokolle	49
5.2. Charakterisierung der T-Zelllinien	51
6. Beantwortung der Fragen	55

7. Zusammenfassung	57
8. Literaturverzeichnis	58
9. Abkürzungsverzeichnis	63

1. Einleitung

Die Transplantation von soliden Organen bei terminalem Organversagen, ein früher noch unmöglich erscheinendes Therapieverfahren, ist heute zu einem gebräuchlichen Vorgehen in der Medizin geworden. Seit den Anfängen der Organtransplantation in den 50er Jahren stieg die Anzahl der Transplantationen in den 70er und 80er Jahren bis zu einem stabilen Niveau in der heutigen Zeit. Dazu beigetragen haben verschiedene Faktoren, wie eine Verbesserung der chirurgischen Technik, der Gewebetypisierung, der Immunsuppression und postoperativen Nachsorge sowie der Beherrschung der intra- und postoperativen infektiologischen Probleme. Mit entscheidend sind aber auch weltweit etablierte Datenbanken der Organspender, die es ermöglichen, rasch einen passenden Empfänger zu finden, sowie ein gut organisiertes System des Organtransportes zum entsprechenden Empfänger. Heute beträgt das 1-Jahres-Patientenüberleben nach Nieren-, Herz- oder Lebertransplantation ca. 95% und das 1-Jahres-Transplantatüberleben etwa 85%.

Die Nierentransplantation ist heute ein weit verbreitetes therapeutisches Verfahren, welches seit der ersten erfolgreichen Transplantation am Peter Bent Brigham Hospital in Boston im Jahre 1954 allgemeine Anerkennung und Akzeptanz gefunden hat. Dies ermöglicht die Dialysepflicht bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu vermeiden und dadurch die Lebensqualität der Patienten deutlich zu steigern. Insgesamt wird, wie einzelne Analysen vermuten lassen, die Prognose hinsichtlich des Langzeitüberlebens nach Transplantation damit verbessert (1). Der Grossteil der Patienten kann nach Nierentransplantation wieder in das Berufsleben zurückkehren.

Das grösste Problem nach Nierentransplantation stellt nach wie vor die chronische Transplantatnephropathie dar, die letztendlich im Verlust der transplantierten Niere endet. Zwar hat sich das 1-Jahres-Transplantatüberleben insbesondere seit der Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA), einem Calcineurin-Inhibitor mit blockierender Wirkung auf die T-Zellrezeptor-Signalübertragung, seit Beginn der 80er Jahre um 10 bis 20 % weiter verbessert (2). Dennoch erscheint es vor dieser Tatsache von besonderer Bedeutung zu sein, dass neue immunsuppressive Medikamente und Therapieprotokolle entwickelt werden, mit denen das Problem des chronischen Transplantatversagens besser beherrscht werden kann.

Die chronische Transplantatabstoßung ist ein noch nicht geklärt immunologischer Vorgang, der zum Verlust funktionsfähiger Nephrone führt, was seinerseits mit Funktionsdefi-

zit und hypertensiven Problemen einhergeht. Verschiedene Risikofaktoren werden für die Entwicklung einer chronischen Immunantwort angenommen, die in nicht-immunogene oder alloantigen-unabhängige und immunogene oder alloantigen-abhängige Faktoren unterteilt werden. Zu den immunogenen Faktoren gehören die HLA-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger, eine inadäquate Immunsuppression und akute Abstoßungsreaktionen. Zu den nicht-immunogenen Faktoren werden z.B. virale Infektionen, eine Schädigung des Transplantates durch Ischämie und Reperfusion u.a. gezählt. Ein nicht passendes Verhältnis zwischen der Größe des Transplantates und der Körpergröße sowie Gewicht des Empfängers und damit der Anzahl an Nephronen, was die Niere durch zu große Filtratmengen schädigen kann, wird ebenso dazu gerechnet.

Die notwendige Immunsuppression des Empfängers wird heutzutage immer noch weitgehend unspezifisch durchgeführt. So werden viele Organsysteme mit inneren und äusseren Körperoberflächen und damit Kontakt zu Erregern und Aussenwelt, wie Darm, Lungen oder Haut, sowie verschiedene biologische Prozesse der Zellteilung einschliesslich der allgemeinen Immunabwehr ungewollt negativ beeinflusst; die Gefahr der Auslösung opportunistischer Infektionen oder lymphoproliferativer Erkrankungen ist insgesamt erhöht. Die Interaktionen mit anderen Medikamenten spielen zudem eine nicht unwichtige Rolle. Vor diesem Hintergrund erscheint eine Klärung der zellulären und molekularen Mechanismen notwendig, da so spezifische, dem Vorgang der chronischen Transplantatnephropathie zugrunde liegende, auf das Transplantat ausgerichtete Medikamente entwickelt werden, die gezielt die Abstoßung unterdrücken und die oben genannten Nebeneffekte zu vermeiden helfen.

Heutzutage gibt es verschiedene Substanzen, wobei die am häufigsten verwendeten Immunsuppressiva das Cyclosporin A (CsA), Tacrolimus (Tac), Mycophenolat Mofetil (MMF), Azathioprin und Sirolimus sind. Sie lassen sich in drei Kategorien einteilen:

- ◆ Pilz- und Bakterienwirkstoffe (Cyclosporin A; Tacrolimus und Sirolimus)
- ◆ Entzündungshemmende Medikamente (Steroide, z.B. Prednisolon)
- ◆ Zytotoxische Mittel (Azathioprin) (3)

Um die akute Abstoßung innerhalb der ersten Monate zu verhindern und so die Akzeptanz eines Transplantates zu ermöglichen, sind nach wie vor die Calcineurin-Inhibitoren CsA oder Tacrolimus (FK 506) das Mittel der Wahl (4-7). Beiden, sowohl CsA, ein Metabolit des Pilzes *Tolypocladium inflatum* Gams, als auch Tacrolimus, eine Makrolidverbindung aus dem Bakterium *Streptomyces tsukabaensis*, ist eine Hemmung der IL-2 Produktion und

anderen pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-3, IL-4, Interferon (IFN)-gamma, Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha, und damit auch eine verminderte T-Zell-Proliferation gemeinsam (8-10). Beide Immunsuppressiva entfalten ihre pharmakologische Wirkung durch Bindung an intrazelluläre Proteine, die so genannten Immunophilinen (9-11). Im Falle von CsA sind dies die Cyclophiline, bei Tacrolimus die FK-bindenden Proteine (4-7). Diese Verbindung aus Immunophilin und Medikament bindet an das durch Calmodulin aktivierte Enzym Calcineurin und hemmt dieses. Calmodulin seinerseits wird durch intrazellulär freigesetzte Calcium-Ionen des endoplasmatischen Retikulums aktiviert (10). Nach der Aktivierung der Phosphatase Calcineurin würde der zyttoplasmatische Transkriptionsfaktor NF-ATc dephosphoryliert werden, in den Zellkern wandern und unter anderem die Transkription der IL-2 Gene induzieren (12). Da sowohl CsA als auch Tacrolimus ihre Wirkung auf ruhende, nicht aktivierte Zellen entfalten, könnte der Behandlung eine Calcineurininhibitor-freie Substanz wie Sirolimus hinzugefügt werden (3, 13, 14). Auch spielt Mycophenolat Mofetil (MMF) und früher auch Azathioprin als Antimetabolit heute eine wichtige Rolle in der Immunsuppression (siehe Abb. 1).

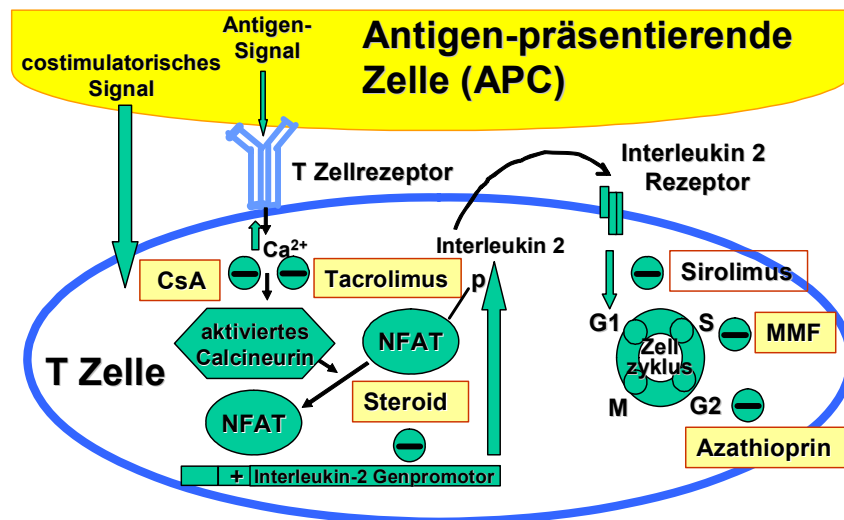


Abb.1 Wirkprinzipien der verschiedenen Immunsuppressiva: CsA, Tacrolimus – als Calcineurininhibitoren; MMF und Azathioprin – als Antimetabolite; Steroide (z.B. Prednisolon – u.a. Hemmung der IL-2 Produktion)

Schwerpunkt der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob MMF aufgrund seines vermuteten günstigen Nebenwirkungsprofils einen protektiven Effekt auf Zellen hat, die potentiell für die Ausbildung der Transplantattoleranz eine wichtige Rolle spielen. Da Sirolimus als Nicht-Calcineurininhibitor zum Zeitpunkt dieser Untersuchung noch keinen nachhaltigen Eingang in die Klinik gefunden hatte, wurde von den drei am häufigsten verwendeten Therapieregimen die Kombination aus Tacrolimus, MMF und Prednisolon als besonders bedeutungsvoll betrachtet. Der Anteil der Patienten mit einer chronischen Abstoßung (CR) war unter dieser Therapie im eigenen Patientengut im Vergleich zur Behandlung mit CsA, MMF und Prednisolon sowie CsA in Kombination mit Prednisolon als Erhaltungstherapie am geringsten ausgeprägt (siehe Abb. 2).

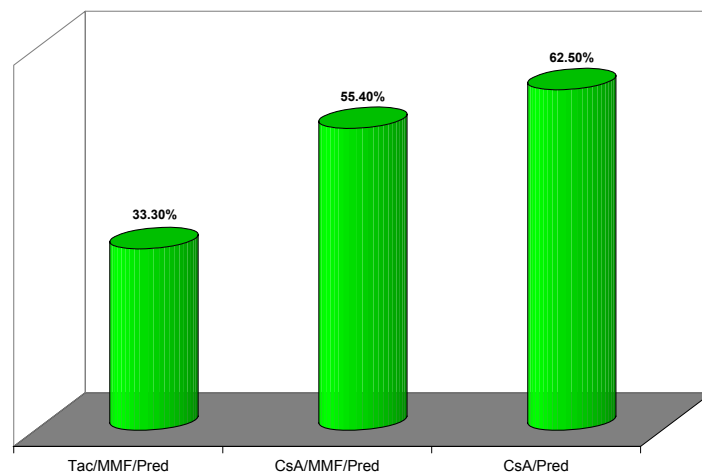


Abb.2. Anteil der Patienten mit CR unter verschiedenen immunsuppressiven Protokollen.
 Tac – Tacrolimus, MMF - Mycophenollat Mofetil, CsA – Cyclosporin A, Ster – Prednisolon

MMF greift in der S-Phase als Antimetabolit in den Zellzyklus ein und behindert dadurch die Lymphozytenproliferation. Dieses Immunsuppressivum findet klinisch in den immunsuppressiven Protokollen immer breitere Anwendung. In dieser Arbeit wurde daher seine Wirkung auf das Immunsystem auf zellulärer Ebene näher untersucht.

Das Risiko eines Transplantatverlustes wird entsprechend der UNOS Datenlage in eine Frühphase nach Transplantation mit relativ hohem Risikopotential (15) und eine nachfolgende Phase mit niedrigem Risiko (16) unterteilt. Viele Studien haben gezeigt, dass ein deutlicher Überlebensvorteil für die Transplantate mit der besseren Übereinstimmung in den für die Transplantation wichtigen Antigenen, v.a. dem Humanen Leukozyten Antigen (HLA), besteht, wobei hauptsächlich die Moleküle A, B und DR eine bedeutende Rolle

spielen. Jedes einzelne hat seine Bedeutung zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Transplantation: der größte Effekt von HLA-A wird nach 3 Jahren beobachtet, der von B innerhalb von 2 Jahren und der von HLA-DR innerhalb der ersten 6 Monate (17). Der Effekt der HLA-Übereinstimmung ist nicht absolut, d.h. 5% der Patienten, die bezüglich des HLA-Musters identisch sind, verlieren trotzdem ihre Transplantate durch eine akute Abstoßung. Das HLA-Match ist für die Niere eines der wichtigsten Faktoren, die sowohl über das kurzfristige als auch das langfristige Transplantatüberleben mitentscheiden.

Die Immunantwort auf Fremdatigene im Körper besteht aus 2 Komponenten: die natürliche oder angeborene Immunität und die antigen-spezifische oder erworbene Immunität. Die natürliche Immunität ist eine nicht-spezifische Reaktion auf jeden Fremdkörper, die mittels Aktivierung von Makrophagen, Neutrophilen, NK-Zellen und des Komplementsystems funktioniert und als erste gegen Alloantigene reagiert. Die zweite Komponente des immunologischen Schutzes besteht in der Erkennung von spezifischen Fremdatigenen, die in Form von Peptiden erkannt werden, die in einer sogenannten Peptidgrube von MHC Molekülen (auch HLA-Moleküle genannt) präsentiert werden. Endogene Peptide werden über MHC Klasse I Moleküle den CD8+ Lymphozyten präsentiert, exogene Peptide werden an MHC II Moleküle gebunden und den CD4+ Zellen dargeboten. Genau diese MHC Moleküle, die vom Spender stammen, sind die wichtigsten Antigene in der Transplantation. Die Bedeutung der MHC Moleküle ist in den letzten Jahrzehnten sehr intensiv erforscht worden. Heute wird ihre besondere Rolle nicht nur bei der Entwicklung der Transplantatabstoßung, sondern gerade bei der Ausbildung der spezifischen Toleranz gegen das Transplantat immer deutlicher.

Bei den humanen MHC Klasse I Molekülen werden die Subtypen A, B, C und bei den MHC Klasse II Molekülen – DP, DQ und DR unterschieden, wobei die Moleküle C, DP und DQ keine entscheidende Rolle bei der Transplantation spielen. Für jedes dieser Moleküle, d.h. genauer für jedes Gen, das diesen Molekülen zugeordnet ist, gibt es eine verschiedene Anzahl an Allelen. Ein Haplotyp repräsentiert ein Gen für jedes Molekül. Das bedeutet, dass bei einem Menschen maximal 12 verschiedene MHC Moleküle vorkommen, falls die korrespondierenden Allele verschieden sind. In dieser Arbeit spielt die Untersuchung der Wirkung der DR-Antigene eine wichtige Rolle, da diese Antigene für die Nierentransplantation von besonderer Bedeutung sind (18).

Das zentrale Ereignis in der T-Zellgebundenen Immunreaktion gegen die fremden Antigene ist die Präsentation von nicht eigenen Peptiden durch die MHC Moleküle. Diese sind damit als entscheidende Determinanten der Organabstoßung zu betrachten. Die Organe, die

zwischen den bezüglich des MHC Musters gleichen Individuen (eineiige Zwillinge) transplantiert wurden, werden normalerweise toleriert. Im Gegensatz dazu werden Organe von Individuen mit einem sich unterscheidenden HLA-Muster zwischen Spender und Empfänger abgestoßen. Die MHC Moleküle sind insofern für den Ablauf der immunologischen Reaktionen unentbehrlich, da T-Zellen fremde Antigene in gelöster Form nicht erkennen können. Nur die Peptid-Bruchstücke (Sequenzen), die auf nichtkovalente Form an MHC Moleküle gebunden sind, werden erkannt und leiten somit die Immunantwort ein.

Die Ereignisse der Alloantigenerkennung sind bei weitem noch nicht vollständig verstanden. Es wird zur Zeit angenommen, dass es zwei verschiedene Wege der Alloantigenerkennung gibt, einen direkten und einen indirekten Weg (siehe Abb. 3 und 4) (19-21). Beide Wege der Antigenerkennung finden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation statt, wobei der direkte Weg der akuten Abstoßung und die indirekte Alloantigenerkennung der chronischen Transplantatabstoßung zugeordnet werden.

Bei dem direkten Weg der Alloantigenerkennung kommen die im Transplantat mitenthaltene antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Spenders in Kontakt mit den CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten des Empfängers. Der MHC Klasse I Peptid-Komplex bzw. MHC Klasse II Peptid-Komplex mit den auf ihnen präsentierten Peptiden werden direkt als fremd erkannt, was zur Aktivierung der T-Lymphozyten führt und eine Immunantwort durch Aktivierung von B-Zellen und alloreaktiven CD8⁺ Zellen einleitet. Da angenommen wird, dass dieser Prozess relativ schnell abläuft, wird der direkte Weg der Alloantigenerkennung der akuten Abstoßung zugeordnet, die innerhalb der ersten Wochen nach Transplantation auftritt. Nach dieser Zeit tritt der direkte Weg in den Hintergrund, da die antigenpräsentierenden Zellen des Spenders nahezu vollständig abgebaut sind (siehe Abb. 3).

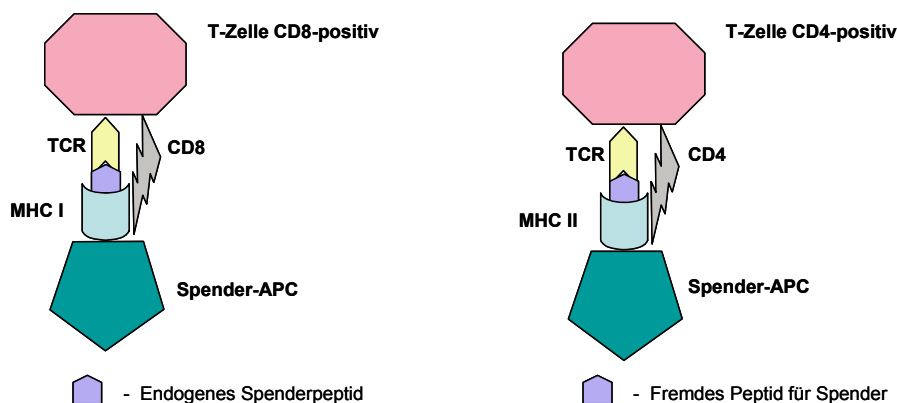


Abb. 3. Prinzip der direkten Alloantigenerkennung am Beispiel der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. TCR, T-Zellrezeptor; APC, antigen-präsentierende Zelle; MHC I, Humanes Leukozytenantigen Typ I; MHC II, Humanes Leukozytenantigen Typ II

Beim indirekten Weg der Alloantigenerkennung werden die MHC Klasse II Moleküle des Spenders in den Empfänger-APC prozessiert und als Peptidsequenzen auf der Oberfläche der MHC Klasse II Moleküle des Empfängers präsentiert. Dieser Vorgang leitet die Immunreaktion ein und aktiviert CD4+ T-Zellen (siehe Abb. 4). Wie in experimentellen Voruntersuchungen beobachtet, spielen die CD8+ Zellen bei der chronischen Transplantatabstoßung keine wichtige Rolle (22). Dem indirekten Weg wird gegenwärtig die entscheidende Rolle bei der Entstehung der chronischen Abstoßung beigemessen, von der 6 Monate nach der Transplantation bei entsprechenden klinischen Zeichen ausgegangen wird. Dabei sind die beiden Wege nach heutigem Verständnis nicht eindeutig voneinander zu trennen, da sie in Kombination mit dem Übergewicht auf der einen oder auf der anderen Seite betrachtet werden (siehe Abb. 4).

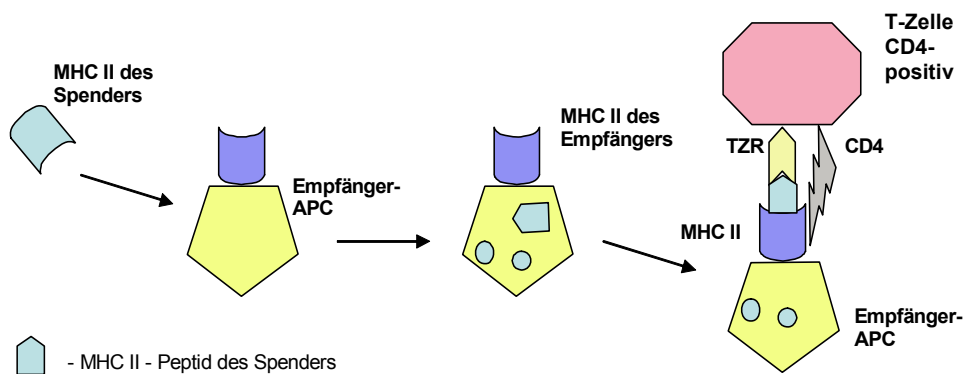


Abb. 4. Prinzip der indirekten Alloantigenerkennung am Beispiel der CD4+ Zellen. TZR, T-Zellrezeptor; APC, antigen-präsentierende Zelle; MHC I, Humanes Leukozytenantigen Typ I; MHC II, Humanes Leukozytenantigen Typ II

Die beiden Wege werden durch verschiedene T-Zelltypen vermittelt, wobei es fraglich ist, ob sie ihre funktionelle Aktivität gleichzeitig oder zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation entfalten (23). Hier spielt die Dichotomie der CD4+ T-Helferzellen in zwei unterschiedliche Populationen eine wichtige Rolle, von denen jede ihr eigenes Profil an Zytokinen exprimiert und damit ihre eigenen Effektorfunktionen vermittelt (24, 25). T-Helferzellen (Th) vom Typ 1 produzieren hauptsächlich IL-2, IFN- γ und TNF- α und fördern die zellvermittelte inflammatorische Immunantwort mit Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten und Makrophagen. T-Helferzellen vom Th-2 Typ sind charakterisiert durch IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und fördern die humorale anti-inflammatorische Immunantwort mit Aktivierung von B-Zellen und von deren Antikörpern Produktion. Es wird angenommen, dass die akute Allotransplantatabstoßung eine überwiegend Th1-vermittelte Immunantwort ist. Bezüglich der chronischen Abstoßung kann das Ausmaß der

Th1- versus Th2-Zytokinaktivität noch nicht exakt abgeschätzt werden. Der Stellenwert der Th2-Zellen für die chronische Abstoßung ist immer noch umstritten. Auf der einen Seite wird vermutet, dass die Alloantikörper, deren Produktion durch Th2-Zellen reguliert wird, eine wichtige Rolle bei der chronischen Abstoßung spielen und somit die Beteiligung der Th2-Zellen an der Transplantatabstoßung mit einbeziehen. Auf der anderen Seite üben die Th2-Zellen regulatorische Funktionen auf die Tätigkeit der Th1-Zellen aus, was eigentlich dafür spricht, dass die Abstoßung unterdrückt wird und es zur Entwicklung einer Transplantattoleranz kommt. Einige Autoimmun- und Transplantationsmodelle zeigten, dass die Toleranzinduktion mit einer sogenannten „Immune Deviation“, d.h. einer Art Umleitung der Immunantwort über andere Effektorarme, insbesondere durch Th2-Zellen und über diese vermittelte Inhibition der Th1-Aktivierung im Zielorgan, verbunden sein kann (24, 26-29). Die Frage bleibt aber weiterhin offen, ob dies letztendlich nützlich oder schädlich für die Transplantatfunktion ist.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die funktionelle Untersuchung von T-Zellen aus peripheren Blutlymphozyten nierentransplantierte Patienten unter verschiedenen immunsuppressiven Behandlungsprotokollen mittels Anwendung der MHC Klasse II-abgeleiteten Peptide. Das Verhältnis der Th1- und Th2-gerichteten Zellen, gemessen mit verschiedenen Verfahren und Methoden, und der Vergleich der Ergebnisse mit der klinischen Situation der transplantierten Patienten bezüglich einer chronischen Transplantatabstoßung und ihrer Medikation könnte Schlussfolgerungen hinsichtlich der Prognose des Transplantatüberlebens und der Optimierung der immunsuppressiven Protokolle ergeben. Es wird vermutet, dass die Medikation, die die Immunantwort in Richtung einer Th2-dominierten Reaktion steuert, zur Entwicklung der Organtoleranz beitragen kann. Darin liegt eventuell der lang gesuchte Schlüssel zur Beherrschung der Probleme der chronischen Transplantatabstoßung und Überwindung der Hindernisse der Organakzeptanz im Empfängerorganismus.

2. Fragestellung

- 2.1. Ist die vergleichende Analyse etablierter T-Zelllinien geeignet, eine Aussage zum Status der Patienten hinsichtlich einer stabilen Transplantatfunktion oder aber einer sich ausbildenden chronischen immunologischen Abstoßung zu treffen?
- 2.2. Sind mit den etablierten T-Zelllinien immunregulatorische Zellen in Patienten nachzuweisen?
- 2.3. Welches Protokoll eignet sich am besten zur Vermeidung der chronischen Abstoßung?
- 2.4. Welchen Einfluss haben die analysierten immunsuppressiven Therapieprotokolle auf das transplantatspezifische T-Zellrepertoire in den untersuchten Patienten?

3. Material und Methoden

3.1. Patienten

3.1.1. Auswahlkriterien

Als Patienten wurden Empfänger allogener Nierentransplantate der Nephrologischen Abteilung der Universitätsklinik Würzburg ausgewählt, bei denen die Transplantation zum Zeitpunkt der Untersuchung mindestens ein Jahr zurücklag und ein HLA-DR Muster vorlag, das eine definierte Differenz in einem HLA-DR Allel zwischen Spender und Empfänger beinhaltet. Die Patienten wurden in zwei Gruppen unterteilt: Patienten der Gruppe A mit Zeichen einer klinisch oder bioptisch gesicherten chronischen Abstoßung (Serumkreatinin ≥ 1.6 mg/dl) oder aber einem zum Zeitpunkt der Untersuchung klinisch stabilem Zustand (Serumkreatinin < 1.6 mg/dl). Für die klinische Studie lag eine Erlaubnis durch die Ethikkommission der Universität Würzburg vor.

3.1.2. Immunsuppressive Behandlungsgruppen

Die Patienten erhielten 4 verschiedene Therapieprotokolle: (1) Gruppe 1: eine Kombination aus Cyclosporin A (CsA), Mycophenolat Mofetil (MMF) und Prednisolon (Pred), (2) Gruppe 2: Tacrolimus (Tac), MMF und Pred, (3) Gruppe 3: CsA und Pred, (4) Gruppe 4: CsA, Azathioprin und Pred. Bei einigen Patienten wurde eine Induktionstherapie mit Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) durchgeführt. In der Tabelle 3.1.2. ist die Anzahl der beteiligten Patienten dargestellt:

Tab. 3.1.2. Therapieprotokolle und Anzahl der Patienten. In Klammern Anzahl der Patienten mit ATG Induktionstherapie

		Gruppe 1 (CsA + MMF+Pred)	Gruppe 2 (Tac+MMF+Pred)	Gruppe 3 (CsA+Pred)	Gruppe 4 (CsA+Azathioprin+Pred)
A	Chronische Abstoßung, Crea $\geq 1,6$ mg/dl	8 (4)	8 (0)	8 (2)	2 (0)
B	Stabile Funktion, Crea $< 1,6$ mg/dl	8 (2)	8 (0)	8 (1)	3 (0)

3.2. Untersuchte Zellen

3.2.1. Gewinnung der mononukleären Zellen

Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) wurden aus dem Blut der ausgewählten Patienten mittels Leucosep Methode über Ficoll-Gradienten [Fa. Amersham Biosciences AB, Freiburg] gewonnen. Die Zellen wurden dabei schonend über 10 Minuten unter 863g zentrifugiert und anschliessend mit RPMI [Fa. Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen] gewaschen. Danach wurden die Zellen in FCS [Fa. Gibco] + 10% DMSO [Fa. Sigma, München] bei -80°C eingefroren oder weiter aufgearbeitet.

3.2.2. Verwendete Peptide

Die Herstellung der synthetischen Peptide erfolgte entsprechend dem hypervariablen Bereich der β -Kette des MHC Klasse II Moleküls nach den Allelen DRB1*0101 (Sequenzen 6-21, 22-41, 42-62, 63-80, 81-94), DRB1*1501 (Sequenzen 1-20, 21-40, 41-60, 61-80, 81-94), DRB1*0301 (Sequenzen 6-21, 22-41, 42-62, 63-80, 81-94), DRB1*0401 (Sequenzen 1-18, 21-42, 62-80), DRB1*0402 (Sequenzen 62-80) und DRB1*0701 (Sequenzen 1-18, 20-41, 50-65, 62-82) [Fa. ProImmune Limited, Littlemore, UK].

3.2.3. Antigenpräsentierende Zellen (APC)

Als antigenpräsentierende Zellen wurden entweder die entnommenen Lymphozyten der Patienten (bestrahlt mit einem Kobalt- β -Strahler bei 30 Gy) oder, wenn nur eine ungenügende Blutmenge verfügbar war, die bei 150 Gy bestrahlten B-Zellen [John Hopkins University Medical Institutions, Baltimore Maryland, USA] verwendet. Diese Zellen entsprachen dem HLA-DR Muster des Empfängers.

3.2.4. Etablierung der Zelllinien

Ein Teil der frisch gewonnenen mononukleären Zellen (MNZ) wurde entsprechend dem HLA-Mismatch sofort mit dem synthetischen Peptid stimuliert und für 3-4 Tage in Kompletmedium kultiviert (bestehend aus 425 ml RPMI-Medium 1640, 50 ml AB-Serum [Fa. PAA, Cölbe, Deutschland], 5 ml Penicillin/Streptomycin [10 000 U/10 000 μ g/ml, Biochrom, Berlin], 5 ml HEPES [1 M, Biochrom], 5 ml [Non-Acid 100 fach, Biochrom], 5 ml Natrium Pyruvat [100 mM, Biochrom], 204 μ l 2-Mercaptoethanol [50 mM, Gibco], 5 ml L-Glutamin [200 mM, Biochrom] plus 55,6 ml humanem T-Stim Kultursupplement ohne PHA (Phytohaemagglutinin) [BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg]. Die Zugabe der APC war bei der ersten Stimulation mit dem Peptid entbehrlich, da APC unter den MNZ

enthalten waren. Die Zugabe des Peptides erfolgte im Verhältnis $50\mu\text{g}/2 \times 10^5$ Zellen. Nach 3-4 Tagen wurden die Zellen mit 311g herunterzentrifugiert, zweimal mit Waschmedium gewaschen (im Kulturmedium wurde das 10% AB-Serum durch 4% FCS [fetal Kälberserum, Gibco] ersetzt und für 5-7 Tage in Kultur gesetzt. Die Zellkulturen wurden während der Kulturphase bei 37°C und 5% CO_2 – Atmosphäre im Brutschrank gehalten. Danach wurden die Zellen erneut stimuliert. Dazu wurden APC entsprechend dem HLA-Muster des Empfängers benutzt. Als APC wurden entweder bestrahlte Blutlymphozyten der Patienten (30 Gy) oder, wenn nur eine ungenügende Blutmenge verfügbar war, käuflich erworbene und bestrahlte (150Gy) Empfänger-HLA-DR-spezifische transformierte B-Zellen verwendet. Für die Zellkultur wurde jeweils ein Überschuss an APC im Verhältnis 4:1 verwendet. Nach der Bestrahlung wurden zu den APC die Peptide in der Konzentration von $50\mu\text{g}/2 \times 10^5$ Zellen hinzugegeben. Die APC wurden für 1,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden sie abzentrifugiert und zu den Lymphozyten hinzugegeben. Dieser Stimulationsvorgang wurde mehrmals im Wechsel von jeweiliger Ruhe- bzw. Stimulationsphase (etwa 7 bzw. 3 Tage) wiederholt, bis die gewünschte Zellzahl für die Analyse der peptid-spezifischen T-Zelllinien vorlag. Diese antigenspezifischen T-Zelllinien wurden anschliessend weiter charakterisiert (siehe Abb.3.2.4). Alle Ansätze wurden mindestens dreimal wiederholt.

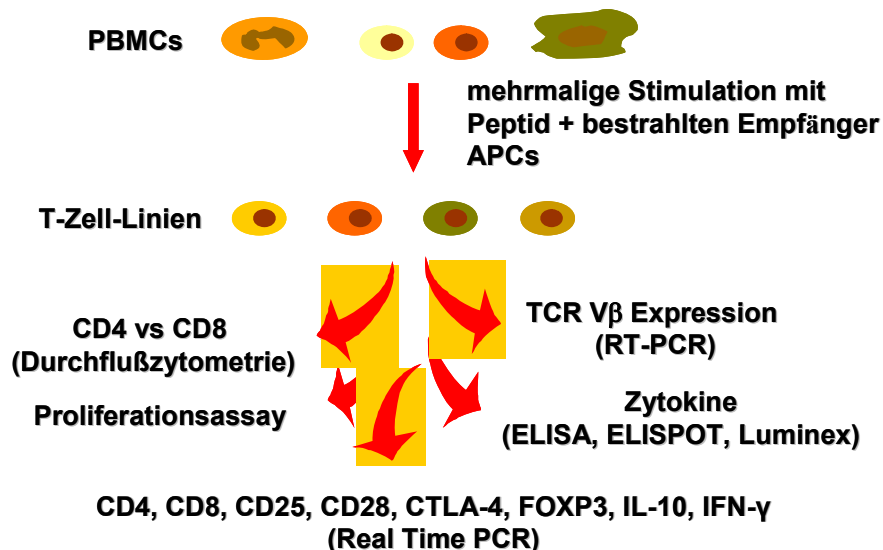


Abb. 3.2.4. Schematische Darstellung der Herstellung und Analyse der T-Zelllinien. PBMCs, Periphere Blut Lymphozyten; FACS, Durchflußzytometrie; ELISA, Enzyme-Linked immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-Linked Immunospot Assay; RT-PCR, Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

3.3. Untersuchungsmethoden

3.3.1. ELISPOT

Die Lymphozyten eines jeden Patienten wurden auf ihre Produktion an IL-10 (typische Zytokine für eine Th2-Antwort) und IFN- γ (typische Zytokine für eine Th1-Antwort) hin überprüft. Dazu wurden 96-Well Platten [Millipore, Schwalbach] verwendet. Sie wurden zuerst über Nacht bei 4°C mit einem humanen IFN- γ Elispot Capture Antikörper (Ausgangskonzentration 1 mg/ml, gelöst im Verhältnis 1:200 in Predilem PBS [Fa. Gibco], 100 μ l Lösung/Well [Fa. BD Biosciences Pharmingen]) bzw. humanem IL-10 Elispot Capture Antikörper mit gleicher Ausgangskonzentration und Verdünnung inkubiert, danach mit RPMI gewaschen [Fa. Gibco] plus 10% FCS [Fa. Gibco] und mit der gleichen Lösung innerhalb von 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Anschliessend wurden die Platten mit Predilem PBS [Fa. Gibco] gewaschen und die entsprechenden Komponenten nach dem in der Abb.3.3.1. aufgeführten Muster zusammenpipettiert, wobei PHA als stimulierende Substanz und somit Positivkontrolle und die Zelllinie mit APC alleine und Zelllinie mit APC und Rattenpeptid als Negativkontrolle verwendet wurden.

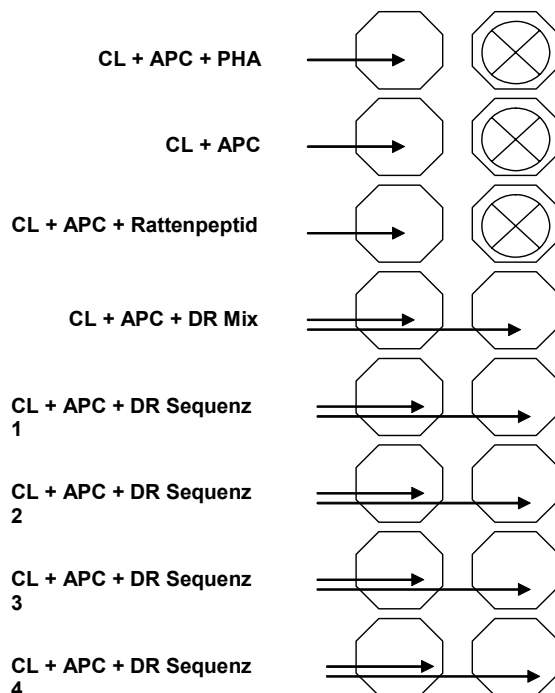


Abb. 3.3.1. Schema der Pipettierung bei Analyse mit Elispot. CL, Zelllinien; APC, antigenpräsentierende Zellen; PHA, Phytohämagglutinin; unspezifisches Rattenpeptid (RT1.D^uβ20-44); DR Mix, Gemisch aus allen Peptidsequenzen, die dem HLA-DR-Muster des Spenders entsprechen; DR Sequenzen, korrespondierende Sequenzen des Peptids, z.B. DRB1*0701 (Sequenzen 1[1-18], 2[20-41], 3[50-65], 4[62-82]).

Die Zellzahl pro untersuchter Zelllinie pro Well betrug $2,5 \times 10^5$ Zellen, ebenso die der APC. Die Menge an Rattenpeptid RT1.D^uβ20-44 und humanen DR Peptiden [ProImmune Limited, Littlemore, UK] betrug 10 µl/well (Konzentration 1 mg/ml). Anschliessend wurde PHA in einem Volumen von 5 µl/well in einer Konzentration von 1 mg/ml hinzugegeben. Bei der Messung von IFN-γ wurden die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert, im Falle von IL-10 dauerte die Inkubation 48 Stunden. Anschliessend wurden die Platten mit PBS und PBS-Tween [0,025%, Gibco] dreimal gewaschen und der sekundäre biotinylierte anti-humane IFN-γ Elispot Detektionsantikörper für 2 Stunden inkubiert (Ausgangskonzentration 0,5 mg/ml, gelöst 1:250 in PBS-Tween [0,025%, Fa. Gibco] sowie BSA [1%, Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg]) bzw. IL-10 Elispot Detektionsantikörper (Ausgangskonzentration 0,5 mg/ml, 1:250 in PBS-Tween 1% BSA). Nach dreimaligem Waschen wurde Streptavidin-HRP [Horse Raddish Peroxidase, Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg] hinzugegeben und die Platten für 1 Stunde inkubiert. Schliesslich wurden 400 µl AEC [1g 3-amino-9-ethyl-carbozol, Sigma, St.Louis, USA] ad 100 ml DMF [N,N-dimethylformamid, Sigma] plus 12 ml AEC Puffer [148 ml 0,2M Essigsäure plus 352 ml 0,2M Natriumacetat ad 1L aqua dest. mit pH 5,0, Fa. Merck, NJ, US] addiert. Die Testansätze liefen dann über 0,45 µm Filter, danach wurde 6 µl 30%-iges H₂O₂ [Fa. Merck] in die Wells hinzugefügt, die Platten mit Alufolie abgedeckt und nach 20 bis 40 Minuten die Entwicklung gestoppt. Die Platten wurden abschliessend im Elispot Reader (ELISA Spot Image Analyzer, Fa. CTL, Cleveland, Ohio, USA) ausgewertet.

3.3.2. ELISA

IFN-γ

Die Untersuchungen wurden zur Detektion des in den Proben enthaltenen Zytokins IFN-γ durchgeführt. Dazu wurden ELISA-Sets [Fa. Biosource International, California, USA] entsprechend den Protokoll-Anleitungen des Herstellers verwendet. In 96-Well Platten, die mit anti-IFN-γ beschichtet waren, wurde pro Well 50 µl Standardprobe, Kontrollansatz und die Proben pipettiert. Danach wurde 50 µl Biotinkonjugat (2. Antikörper gegen IFN-γ) hinzugegeben. Anschliessend wurden die Platten für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert, viermal gewaschen und 100 µl Streptavidin-HRP *Working Solution* in die Wells pipettiert und die Platte für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten erneut viermal gewaschen, 100 µL *Stabilized Chromogen* hinzugeführt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schliesslich wurde 100 µl *Stop Solution* hinzupipettiert. Die Ergebnis-

se wurden am ELISA-Reader bei 450 nm abgelesen [Dynatech Laboratories, Sullyfield, USA] (zum Funktionsprinzip siehe Abb. 3.3.2.)

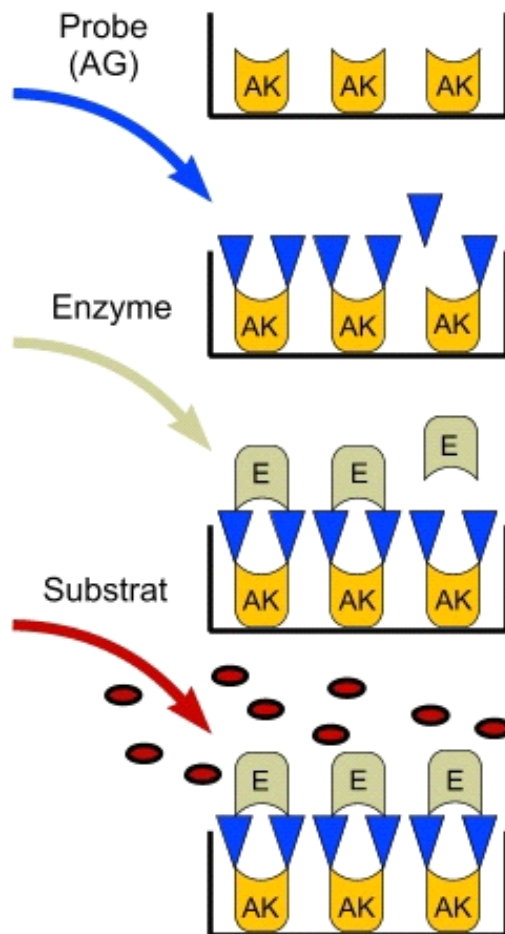


Abb. 3.3.2. Funktionsprinzip der ELISA-Messung. AG, Antigen; AK, Antikörper; E, Enzym

TGF- β

Entsprechend dem Vorgehen zur Bestimmung von IFN- γ wurde in die Wells von 96-Well Platten, die mit anti-TGF- β beschichtet waren, zuerst 200 μ l der Standardprobe, die Kontrollen und Proben pipettiert. Dazu wurde 50 μ l Biotinkonjugat zugesetzt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten viermal gewaschen. Es wurden 100 μ l Streptavidin-HRP *Working Solution* dazu pipettiert und die Platten waren für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die weiteren Schritte entsprechen denen der ELISA Messung von IFN- γ .

IL-10

Entsprechend dem Vorgehen zur Bestimmung von IFN- γ wurde in die Wells von 96-well Platten, die mit anti-IL-10 beschichtet waren, zuerst 50 μ l Standardprobe, die Kontrollen und Proben pipettiert. Dazu wurde noch zusätzlich 50 μ l Inkubationspuffer gegeben. Die Platten wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten viermal gewaschen. Anschliessend wurden 100 μ l Biotinkonjugat hinzugegeben und die Platte war für 2 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurde sie erneut viermal gewaschen, es wurden 100 μ l Streptavidin-HRP *Working Solution* hinzugegeben. Im Anschluss war die Platte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Ablauf dieser Zeit wurden die Platten ausgeschüttet und viermal gewaschen. Die weiteren Schritte entsprechen denen der ELISA Messung von IFN- γ .

3.3.3. Luminex

Die Luminex-Messungen (zum Funktionsprinzip siehe Abb. 3.3.3.) wurden zur Bestimmung weiterer exprimierter Zytokine der T-Zelllinien durchgeführt. In 96-Well Platten wurden 25 μ l antikörper-beschichtete Mikrosphären platziert [Gemisch aus den Zytokinen GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α ; Fertig Kit, Fa. Biosource International, California, USA]. Nach zweimaligem Waschen wurde in jedes Well 50 μ l Inkubationspuffer, 50 μ l fertige Probenverdünnung und 50 μ l Probe pipettiert. Die Platten wurden für 2 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert und erneut zweimal gewaschen. Danach wurde in jedes Well 100 μ l des biotinylierten Detektionsantikörpers gegeben, für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert, und wieder zweimal gewaschen. In jedes Well wurde 100 μ l SAV-RPE (R-Phycoerythrin-Fluoreszenzfarbstoff, Fa. Biosource International) pipettiert, die Platten für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln erneut geschüttelt und dreimal gewaschen. Jeder Testansatz wurde mit 100 μ l Waschpuffer pro Well als Endvolumen eingestellt und die Platten im Luminex-Reader (Luminex 100, Fa. Luminex Applied Systems, Sheffield, UK).

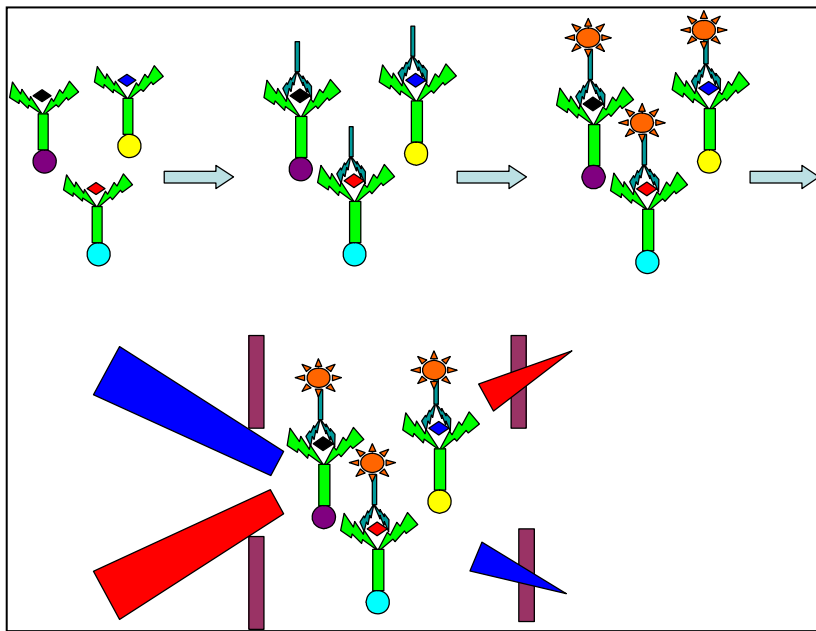


Abb. 3.3.3. Prinzipien des Luminex. Aus Polystyrol bestehende Mikrosphären werden intern mit spektral unterscheidbaren Fluorochromen gefärbt und definieren ein Set von Signaturbeads (Bead-Mix). Jedes Set dieser Signaturbeads trägt ein spezifisches Detektionsreagenz (wie zB Oligonukleotidproben, rekombinante Antigene oder spezifische Proteine) auf der Oberfläche. Analyten, die in der zugegebenen Probe enthalten sind, binden an die Detektionsreagenzien auf den Beads. Ein Detektionsantikörper, der mit einem anderen Fluorochrom gekoppelt ist, quantifiziert die Reaktion auf der Beadoberfläche. Die biomolekulare Interaktion wird im Luminex-Reader Analyzer durch ein Lasersystem quantifiziert.

◆ - Zytokin, Y - Beads-konjugierter Detektionsantikörper, ★ - SAV-RPE
Y (R-Phycoerythrin-Fluoreszenzfarbstoff), Y - Biotinylierter Detektionsantikörper

3.3.4. Proliferationsassay

Nach der Etablierung der T-Zelllinien wurden 2×10^5 T-Zellen mit der gleichen Anzahl an APC in 96-Well Platten [VWR, Darmstadt] inkubiert. Als Kontrollen dienten alleiniges Kulturmedium, T-Zellen mit Kulturmedium, APCs mit Kulturmedium, T-Zellen mit APC und dem synthetischen Rattenpeptid RT1.D^uβ20-44 (10 µl, Konzentration 1 mg/ml) zur Stimulation der Kontrolle, T-Zellen mit APC, T-Zellen mit APC und PHA (5µl, Konzentration 1 mg/ml) und als Versuchsansatz T-Zellen zusammen mit APC und der entsprechenden jeweiligen humanen Peptidsequenz (10 µl, Konzentration 1 mg/ml). Die Platten wurden 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend mit 3[H]-Thymidin (1µCi) [Amersham Biosciences Europe, Freiburg] gepulst sowie weitere 18 Stunden inku-

biert. Danach wurde die Proliferation der Zellen mittels DNA-Reduplikation in einem β -Counter [Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden] gemessen.

3.3.5. FACS (Durchflusszytometrie)

Die generierten Zellen der Zellkultur wurden mittels Zentrifuge [311g, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold] auf das Zellpellet herunterzentrifugiert. Danach wurden die Pellets (2×10^5 Zellen/Ansatz) mit humanen anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD25, -CD28 Antikörpern und korrespondierenden Isotypen für zehn Minuten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert und anschliessend gewaschen. Daraufhin wurden die Röhrchen mit 1 ml Isoton gefüllt und gleich gemessen [Beckmann Coulter, Krefeld] (siehe Tab.3.3.5.; Prinzip der FACS-Färbung und -Messung wird in der Abb.3.3.5. dargestellt).

Tab. 3.3.5. Übersicht der Primärantikörper, die zur FACS-Analyse verwendet wurden. CD, Differenzierungscluster; PE, Phykoerythrin; FITC, Fluoreszein-Isothiocyant; PC5-PE CyChrome 5

AK	Spezies	Klon	Isotyp	Zielzelle	Format	Katalog-Nr.	Firma
CD3-ECD	Human	UCHT-1	IgG1-FITC	Reife T-Zellen, Thymozyten	LIQ	IM2705	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CD4-PC5	Human	13B8.2	IgG1-FITC	T-Helferzellen	LIQ	IM2636	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CD8-ECD	Human	SFC121Th y2D3 (T8)	IgG1-FITC	Zytotoxische T-Lymphozyten, T-Suppressor-Zellen, NK-Zellen	LIQ	6604728	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CD25-PE	Human	B1.49.9	IgG2A-PE	Lymphozyten	LIQ	IM0479	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CD28-PE	Human	CD28.2	IgG1-FITC	T-Zellen	LIQ	IM2071	Beckman Coulter (Krefeld, D)

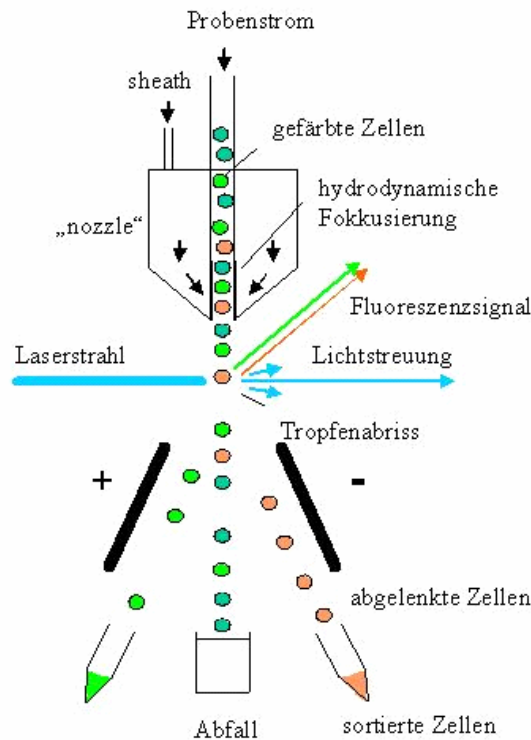


Abb. 3.3.5. Grundprinzipien der Methodik der Durchflusszytometrie: Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung - aneinandergereiht - an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, wenn sich die eingesetzten Farbstoffe in den Emissionsspektren unterscheiden.

3.3.6. Immunfluoreszenz und Cytospins

Diese Methode dient der Veranschaulichung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Um die T-Zelllinien auf Objektträger zu adhären wurden diese in eine Shandon Cytospin 2 Zentrifuge [Thermo Shandon, Pittsburgh, USA] eingespannt. Die Zentrifuge enthält 12 Positionen zur Befestigung der Objektträger. Zwischen dem Objektträger und dem Einfülltrichter wird ein gelochtes Papier zum Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit angebracht.

Nach dem Auftauen (-80°C) wurden die Zellen herunterzentrifugiert und zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurde $50\ \mu\text{l}$ der Zellsuspension mit 2×10^6 Zellen/ml einer jeden Probe in die Trichter gefüllt und die Objektträger für 1 min unter 550 G zentrifugiert. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Dann wurden sie entsprechend dem Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung bearbeitet. Die Cytospins aus dem Gefrierschrank bei -20°C wurden in vorgekühltem Aceton (20 min bei -

20°C) für 10 min fixiert. Als Nächstes wurden sie für 30 min luftgetrocknet, beschriftet und dreimal für je 5 min in Tris-NaCl-Puffer bei pH 7,4 [ohne BSA, Fa. Merck] gespült. Anschließend wurde für 15 min je 100 µl verdünntes Antikörper-Diluent [Chemmate, Antibody Diluent, DakoCytomation GmbH, bHamburg] auf die Cytospins aufgetragen. Danach wurden die Zellen mit den unkonjugierten Primärantikörpern markiert (siehe Tab.3.3.6.).

Tab. 3.3.6. Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Hersteller, Cat.-No.	Ausgangskonzentration (mg/l)	Verdünnungsfaktor
CD4-FITC	Dako, F0766	80	1:10
CD8-FITC	Dako, F0765	50	1:10
CD8-Cy3	Dako, M7103	200	1:50
CD25	BD, 555430	100	1:10
CD28	Dako, M7162	165	1:10

Als Antikörperkombinationen wurden CD4/CD25, CD4/CD8 und CD8/CD28 verwendet. Nach der Inkubation mit 100 µl Primärantikörper (60 min bei Raumtemperatur) wurden die Platten dreimal für je 5 min gewaschen. Die weiteren Schritte fanden im Dunklen statt. Dabei wurden 500 µl Donkey-a-mouse-Cy3 Antikörper [Jackson Immuno Research, West Grove, USA] 1:100 verdünnt für 60 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach dem Waschen wurde Maus-Serum [Fa. Biozol, Eching] 1:20 verdünnt in Tris-Puffer [Fa. Merck] für 60 min bei Raumtemperatur auf die Objektträger aufgetragen. Daraufhin wurde nach dem Waschen FITC konjugierter CD4-Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Anschließend wurden die Objektträger gewaschen und mit Fluoreszenz-Eindeckmittel [Biozol, Fluoromount, Eching] eingedeckt. Die nachfolgende Auswertung fand an einem Fluoreszenzmikroskop der Fa. Leica Camera AG, Solms statt.

3.3.7. RT-PCR

Die Untersuchungen mittels Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion wurden zur Vervielfältigung der für die Studie relevanten Gene durchgeführt (siehe Abb. 3.3.7.).

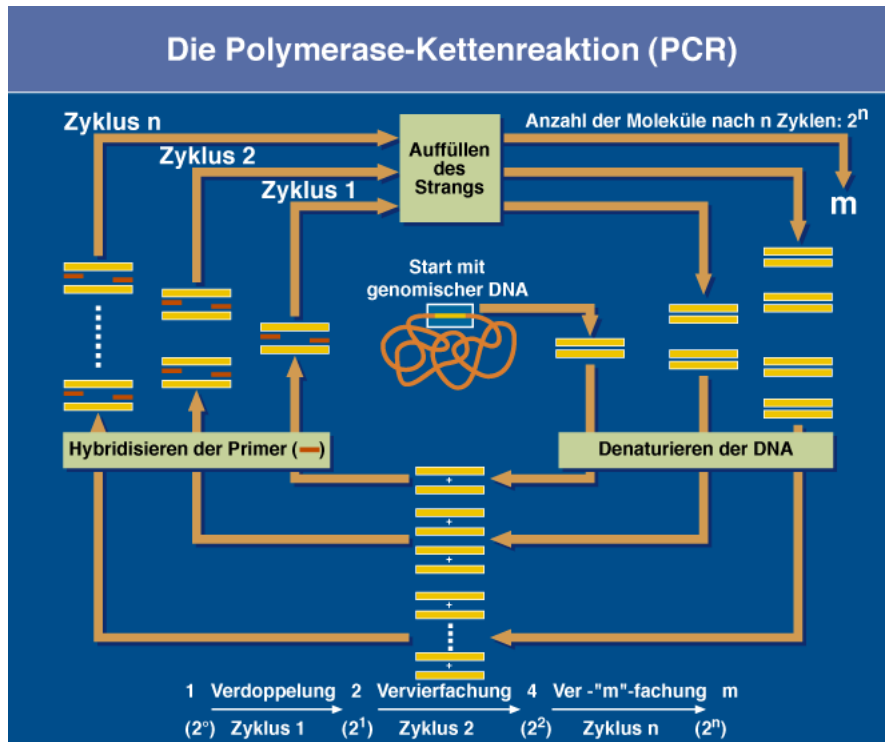


Abb. 3.3.7. Vereinfachte Darstellung der PCR-Methodik

3.3.8. Real-time RT-PCR

Die Methode der 'Real-time reverse transcription polymerase chain reaction' (kurz: Real-time RT-PCR) wird zur Bestimmung der Expression von verschiedenen Genen eingesetzt. Diese Methode erlaubt die Quantifizierung der Expression eines fraglichen Gens in Relation zu den Kontrollgenen. Im Folgenden werden dazu die angewandten Schritte kurz dargestellt:

Zunächst wurden spezifische Primer für die zu untersuchenden humanen Gene hergestellt. Dazu wurde die spezielle Software 'Primer Express' [Applied Biosystems, FoPred City, USA] verwendet. 'Forward' and 'Reverse' Primer wurden dabei so ausgewählt, dass sie eine Länge zwischen 18 und 22 Basenpaaren aufwiesen und das Amplifikationsprodukt eine Länge von 51 Basenpaaren besaß. Gleichzeitig wurde die zu amplifizierende Gensequenz so gewählt, dass sie möglichst einen Intron-Exon Übergang beinhaltete. Spezifität und Sensitivität der Primer wurden über die Auswertung von Amplifikations- und Dissoziationskurven von Verdünnungsreihen und von Kontrollen ohne cDNA (sog. 'non-template controls') geprüft.

Als Referenzgene wurden die sogenannten 'house-keeping Genes' Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Cyclophilin verwendet. Zur Durchführung der

PCR wurde zunächst RNA aus den zu untersuchenden Zellen gewonnen. Die Zellen wurden homogenisiert und RNA mittels 'TRI Reagent' [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA] isoliert. Die Qualität der RNA wurde über eine Gel-Elektrophorese bestimmt. Die gewonnene RNA wurde mittels 'SuperScript II RNase RT' [Gibco, Carlsbad, USA] in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. In diesem Schritt wurde darauf geachtet, dass ausreichend RNA transkribiert wurde um alle in Frage kommenden Gene mit dem gleichen Ansatz von cDNA messen zu können. Die PCR wurde mit dem Gerät 'GeneAmp 5700 sequence detection system' [Applied Biosystems] durchgeführt. Für jedes zu untersuchende Gen wurden 250 ng cDNA, 5 μ M 'forward primer' (FW), 5 μ M 'reverse primer' (RE) und 10 μ l 'SYBR Green PCR MaPred Mix' [Applied Biosystems] verwendet. Die Bestimmung der genspezifischen PCR-Produkte erfolgte kontinuierlich. Dabei wurde die Zunahme der Fluoreszenz als Folge der Bindung von SYBR Green an die Doppelstrang DNA bei jedem der insgesamt 40 PCR Zyklen gemessen. 'Dye ROX', das im SYBR Green PCR MaPred Mix enthalten war, wurde als passive Referenz verwendet, um damit auf nicht-PCR-abhängige Fluktuationen der Fluoreszenzsignale zu normalisieren. Die für die einzelnen Genprodukte gemessenen Amplifikationskurven wurden graphisch dargestellt und in Relation zur Kurve des Kontrollgens ausgewertet. Um die Zielvorlage mengenmäßig zu bestimmen, wurde der durchschnittliche CT-Wert (Schwellenzyklus), also die Anzahl der Zyklen, innerhalb derer die Fluoreszenz des Reporters eine fixierte Schwelle oberhalb der Basiswerte erreicht, bemessen. Dann wurde die Differenz (Δ CT) zwischen den durchschnittlichen Ct-Werten der Muster in den vorgegebenen Wells und denen des organisatorischen Gens GAPDH gemessen; Berechnung der Differenz ($\Delta\Delta$ CT) zwischen den durchschnittlichen Δ Ct-Werten der Muster für jedes Ziel und der Δ Ct-Wert des Kontrollmusters für dieses Ziel folgte. Dieser relative Quantifizierungswert wird als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ausgedrückt.

4. Ergebnisse

4.1. Patienten

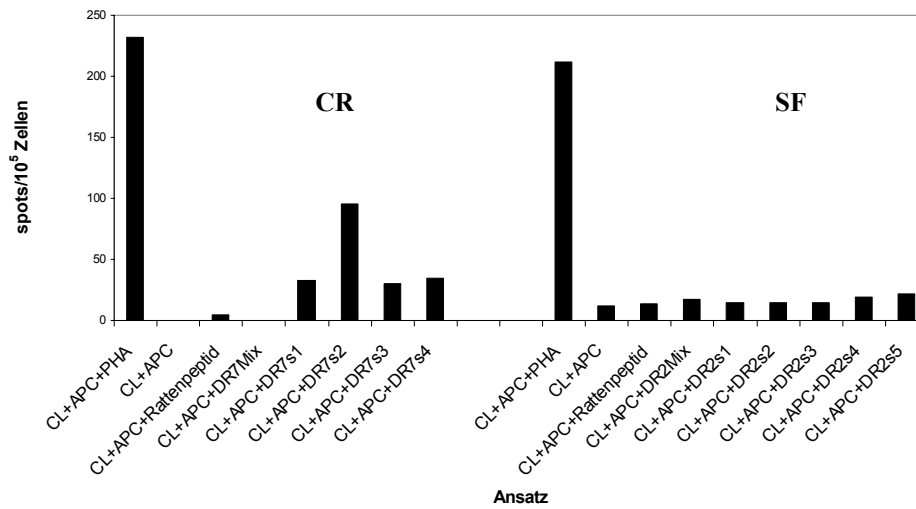
Alle untersuchten Patienten der Studie wurden hinsichtlich ihrer Therapieregime und ihres Transplantatstatus in zwei Kategorien mit chronischer Abstoßung (Gruppe 1A, 2A, 3A) und mit stabiler Transplantatfunktion (Gruppe 1B, 2B, 3B) unterteilt. Dafür wurden aus dem Gesamtkollektiv mit 630 Patienten mit bekannter Spender-Empfänger HLA-Übereinstimmung über einen Zeitraum von Januar 2000 bis Juli 2003 107 Patienten nach Nierentransplantation untersucht. Klinische Zeichen einer chronischen Abstoßung fanden sich je nach immunsuppressivem Protokoll in unterschiedlich starker Ausprägung. Bei den untersuchten immunsuppressiven Protokollen fand sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte chronische Abstoßung (Tac, MMF und Prednisolon: 33,3%, CsA, MMF und Prednisolon: 55,4 % sowie CsA und Prednisolon: 62,5 %). Deswegen wurde der Kombination Tac, MMF und Prednisolon besonderes Interesse beigemessen. Zuerst wurden T-Zelllinien aus Patienten mit chronischer Abstoßung und stabiler Transplantatfunktion aus jeder Gruppe (n=8/Gruppe) etabliert (siehe 3.2.4., Materialien und Methoden). T-Zelllinien etabliert und weiter untersucht.

4.2. Charakterisierung der Zytokinexpression der T-Zelllinien im ELISPOT

4.2.1. Immunsuppression mit CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1A und 1B)

Die Ergebnisse der ELISPOT-Untersuchungen zeigten, dass bei Patienten mit chronischer Abstoßung eine deutlich höhere Expression von IFN- γ als Antwort auf das spezifische Peptid (DRB1*0701, Sequenz 2 [Aminosäuren 20-41]) vorhanden war als bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (DRB1*1501, Sequenz 2 [Aminosäuren 21-40], 95 versus 15 Spots/ 10^5 Zellen). Bei stabilen Patienten fanden sich im Gegensatz dazu eine signifikant grössere IL-10 Expression (DRB1*1501, Sequenz 2 [Aminosäueren 21-40] versus DRB1*0701 Sequenz 2 [Aminosäuren 21-40], 139 vs 25 Spots/ 10^5 Zellen, siehe Abb. 4.2.1). Ähnliche Ergebnisse wurden bei den anderen Patienten dieser Gruppe gesehen. Bei vier Patienten, zwei chronischen und zwei stabilen, wurde eine annähernd gleich starke Expression von IL-10 und IFN- γ gesehen. Bei einem stabilen Patienten fand sich gar keine IL-10 Expression.

IFN- γ -Expression (Gruppe 1A und 1B)



IL-10-Expression (Gruppe 1A und 1B)

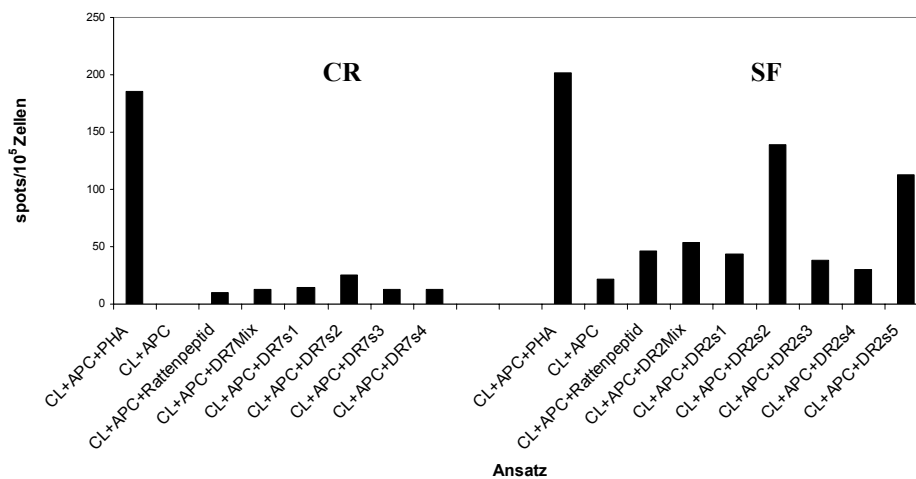
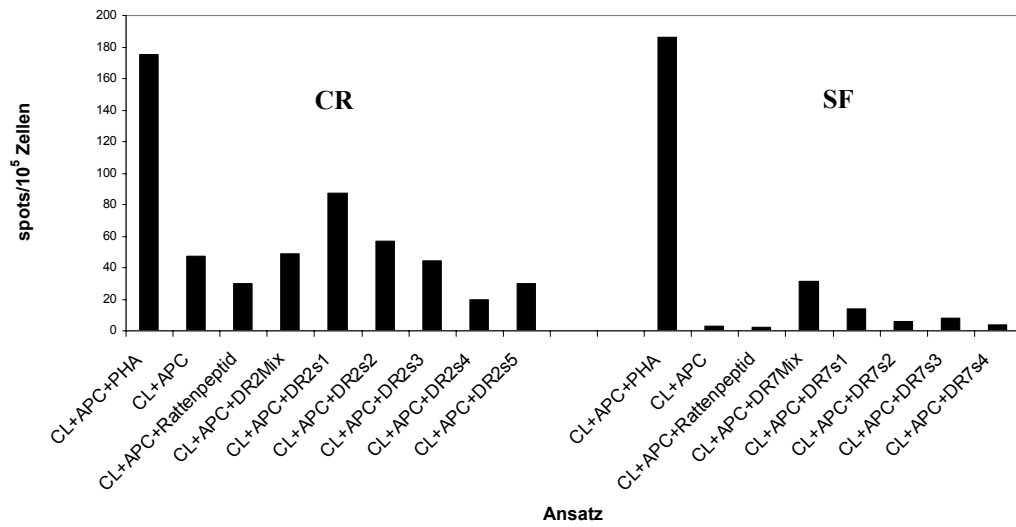


Abb. 4.2.1. Repräsentative ELISPOT-Untersuchung der Zytokin-Expression der T-Zelllinien bei zwei Patienten aus der Behandlungsgruppe CsA, MMF und Prednisolon. Patient (links) mit chronischer Abstoßung, Gruppe 1A (Serumkreatinin 3,7 mg/dl), Patient (rechts) mit stabiler Transplantatfunktion, Gruppe 1B (Serumkreatinin 0,7 mg/dl). CL, T-Zelllinie; APC, Antigen-präsentierende Zellen; DR7, DRB1*0701; DR2, DRB1*1501; s, entsprechende Sequenz; PHA, Phytohaemagglutinin; Rattenpeptid RT1.D^uβ20-44; CR, chronische Abstoßung; SF, stabile Transplantatfunktion. Diese Abbildung ist repräsentativ für CR: 6 von 8 Patienten, für SF: 5 von 8 Patienten.

4.2.2. Immunsuppression mit Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2A und 2B)

Die T-Zelllinien aus Patienten mit chronischer Abstoßung wiesen höhere Expressionen an IFN- γ auf (Peptid DRB1*1501, Sequenz 1 [Aminosäuren 1-20]) als die aus Patienten mit der stabilen Transplantatfunktion (Peptid DRB1*0701, Sequenz 1 [Aminosäuren 1-18], 87 vs. 14 Spots/ 10^5 Zellen). Dagegen war die IL-10 Expression bei stabilen Patienten (Peptid DRB1*0701, Sequenz 1 [Aminosäuren 1-18]) deutlich höher als bei Patienten mit der chronischen Abstoßung (DRB1*1501, Sequenz 1 [Aminosäuren 1-20], 125 vs. 22 Spots/ 10^5 Zellen, siehe Abb. 4.2.2.). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei den meisten anderen Patienten mit chronischer Abstoßung sowie stabiler Transplantatfunktion beobachtet. Bei einem chronischen und zwei stabilen Patienten wurden etwa gleiche Mengen an IFN- γ und IL-10 exprimiert.

IFN- γ -Expression (Gruppe 2A und 2B)



IL-10-Expression (Gruppe 2A und 2B)

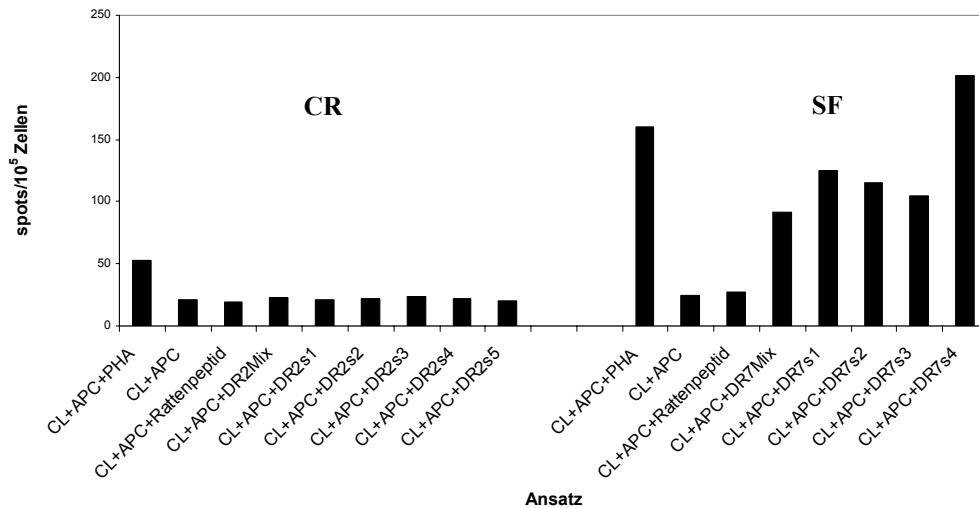


Abb. 4.2.2. Repräsentative ELISPOT-Untersuchung der Zytokin-Expression der T-Zelllinien bei zwei Patienten aus der Behandlungsgruppe Tac, MMF und Prednisolon. Patient (links) mit chronischer Abstoßung, Gruppe 2A (Serumkreatinin 1,8 mg/dl). Patient (rechts) mit stabiler Transplantatfunktion, Gruppe 2B (Serumkreatinin 0,9 mg/dl). CL, T-Zelllinie; APC, Antigenpräsentierende Zellen; DR2, DRB1*1501; DR7, DRB1*0701; s, entsprechende Sequenz; PHA, Phytohaemagglutinin; Rattenpeptid RT1.D^u β 20-44; CR, chronische Abstoßung; SF, stabile Transplantatfunktion. Diese Abbildung ist repräsentativ für CR: 7 von 8 Patienten, für SF: 6 von 8 Patienten.

4.2.3. Immunsuppression mit CsA und Prednisolon (Gruppe 3A und 3B)

Die T-Zelllinien aus Patienten mit der chronischen Abstoßung wiesen insgesamt höhere IFN- γ Produktion (DRB1*1501, Sequenz 1 [Aminosäuren 1-20]) auf als die T-Zelllinien aus stabilen Patienten (DRB1*0401, Sequenz 1 [Aminosäuren 1-18]), wobei der Unterschied in den Mengen des Zytokins verhältnismäßig geringer war als in den vorigen zwei Beispielen (22 vs. 9 Spots/ 10^5 Zellen). Die Produktion von IL-10 war fast ausschließlich bei Patienten mit der stabilen Transplantatfunktion vorhanden (DRB1*0401, Sequenz 1 [Aminosäuren 1-18] vs. DRB1*1501, Sequenz 1 [Aminosäuren 1-20], 35 vs. 2 Spots/ 10^5 Zellen, siehe Abb. 4.2.3). Bei einem Patienten aus der stabilen Gruppe wurden etwa gleiche Mengen an IFN- γ und IL-10 exprimiert. Bei zwei chronischen Patienten konnte keine IFN- γ -Expression gemessen werden.

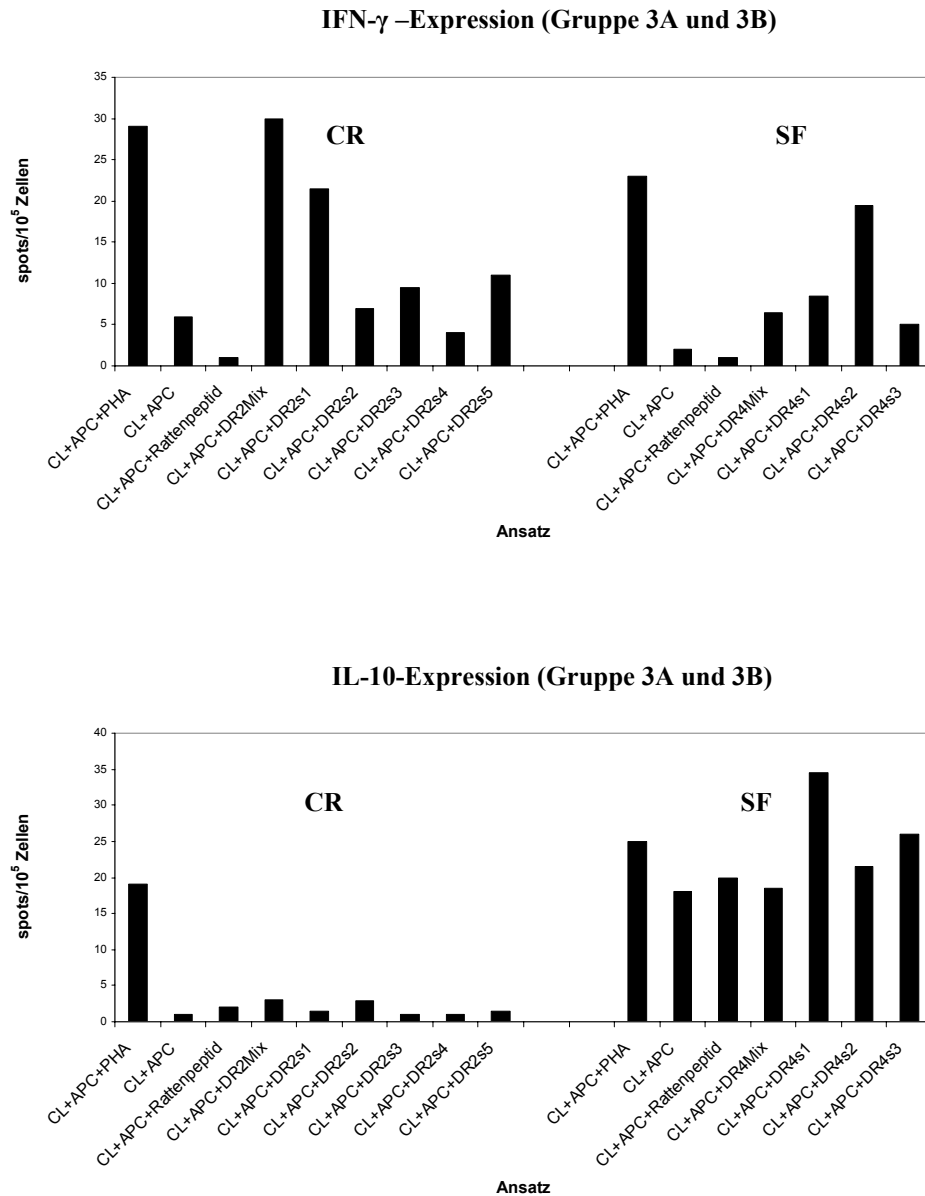


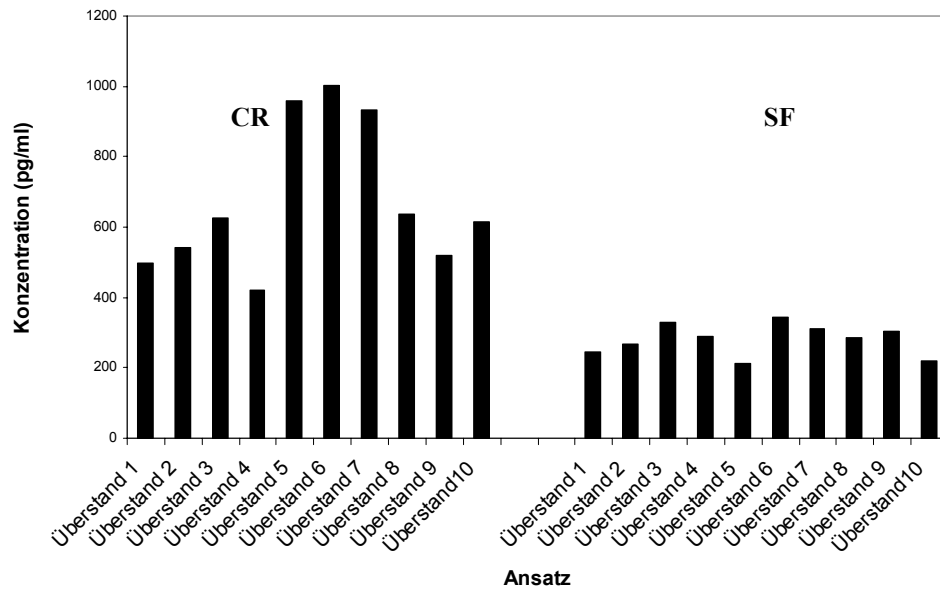
Abb. 4.2.3. Repräsentative ELISPOT-Untersuchung bei zwei Patienten aus der Behandlungsgruppe CsA und Prednisolon. Patient (links) mit chronischer Abstoßung, Gruppe 3A (Serumkreatinin 2,9 mg/dl). Patient (rechts) mit stabiler Transplantatfunktion (Serumkreatinin 1,4 mg/dl). CL, T-Zelllinie; APC, Antigen-präsentierende Zellen; DR2, DRB1*1501; DR4, DRB1*0401; s, entsprechende Sequenz; PHA, Phytohaemagglutinin; Rattenpeptid RT1.D^u β 20-44; CR, chronische Abstoßung; SF, stabile Transplantatfunktion. Diese Abbildung ist repräsentativ für CR: 6 von 8 Patienten, für SF: 7 von 8 Patienten.

4.3. Charakterisierung der T-Zelllinien im ELISA

4.3.1. Immunsuppression mit CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1A und 1B)

Die Überstände der Zellkulturen, die im Laufe der Anzucht der Zelllinien entstanden, wurden auf ihren Gehalt an TGF- β , IFN- γ und IL-10 untersucht. Dies wurde mittels ELISA-Verfahren für die jeweiligen Zytokine durchgeführt. In den meisten Fällen (siehe Texte bei den Abbildungen) zeigte sich, dass in den Kulturen aus chronischen Patienten der Gehalt an IFN- γ höher war als in Kulturen, die aus Patienten mit stabiler Nierentransplantatfunktion stammten (siehe Abb.4.3.1., Überstand 6, CR: 1003,96 pg/ml vs. SF: 365,99 pg/ml). Nur die T-Zelllinien aus Patienten mit stabiler Transplantatfunktion produzierten IL-10, welches in einigen Kulturüberständen deutlich nachweisbar war (siehe Abb.4.3.1., Überstand 8, CR: 0 pg/ml vs. SF: 342,12 pg/ml). In den übrigen Fällen waren entweder die Verhältnisse der Zytokinmengen umgekehrt oder sie konnten gar nicht gemessen werden.

IFN- γ -Expression (Gruppe 1A und 1B)



IL-10-Expression (Gruppe 1A und 1B)

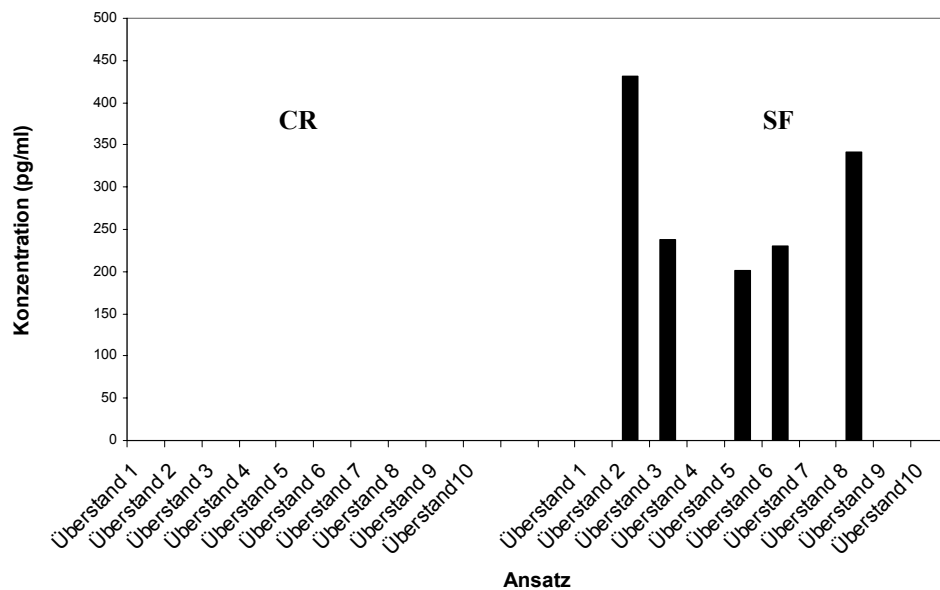


Abb. 4.3.1. Repräsentative ELISA-Untersuchungen hinsichtlich der IFN- γ und IL-10 Expression der T-Zelllinien bei zwei Patienten aus Gruppe 1A und 1B mit CsA, MMF und Prednison. Patient (links) mit chronischer Abstoßung (Serumkreatinin 2,3 mg/dl). Patient (rechts) mit stabiler Transplantatfunktion (Serumkreatinin 1,5 mg/dl). CR, chronische Abstoßung; SF, stabile Transplantatfunktion; Überstände 1-10, Überstände der Zellkulturen, die im Laufe der Anzucht der T-Zelllinien gesammelt wurden, zeitgerechte Reihenfolge. Diese Abbildung ist repräsentativ für CR: 6 von 8 Patienten, für SF: 6 von 8 Patienten.

4.3.2. Immunsuppression mit Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2A und 2B)

Nur die T-Zelllinien aus Patienten mit stabiler Transplantatfunktion produzierten IL-10. Keine Produktion von IL-10 wurde dagegen in Patienten mit chronischer Abstoßung gefunden, ausschliesslich bei ihnen wurde jedoch die Produktion von IFN- γ festgestellt (siehe Abb. 4.3.2.).

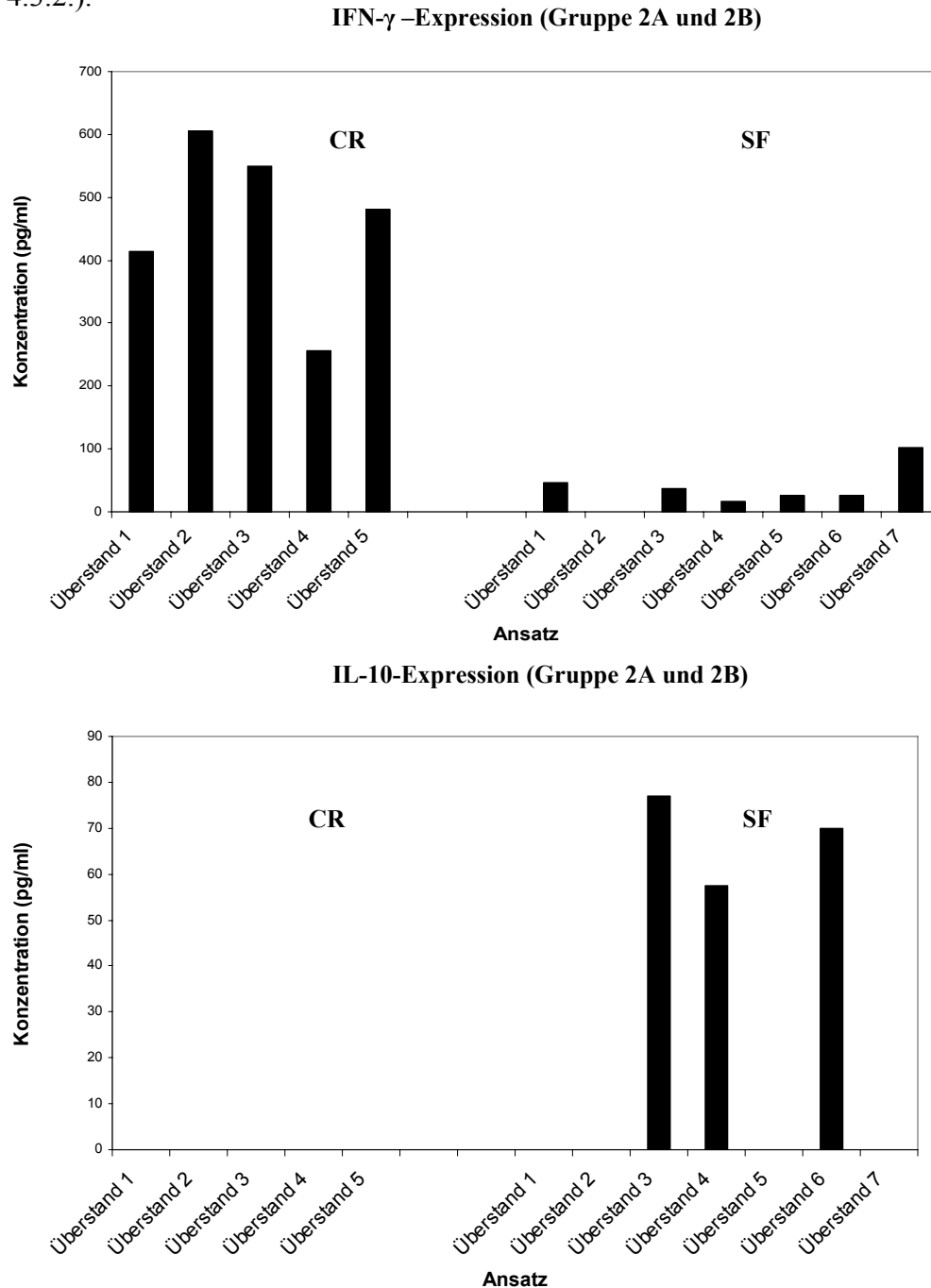


Abb. 4.3.2. Repräsentative ELISA-Untersuchungen hinsichtlich der IFN- γ und IL-10 Expression der T-Zelllinien bei zwei Patienten aus Gruppe 2A und 2B mit Tac, MMF und Prednisolon. Patient (links) mit chronischer Abstoßung (Serumkreatinin 2,3 mg/dl). Patient (rechts) mit stabiler Transplantatfunktion (Serumkreatinin 1,3 mg/dl). CR, chronische Abstoßung; SF, stabile Transplantatfunktion; Überstände 1-5 und 1-7, Überstände der Zellkulturen, die im Laufe der Anzucht der T-Zelllinien gesammelt wurden, zeitgerechte Reihenfolge. Diese Abbildung ist repräsentativ für CR: 6 von 8 Patienten, für SF: 6 von 8 Patienten.

4.3.3. Immunsuppression mit CsA und Prednisolon (Gruppe 3A und 3B)

Die T-Zelllinien aus Patienten mit chronischer Abstoßung produzierten IFN- γ aber gar kein IL-10. Die Zelllinien aus stabilen Patienten produzierten dagegen IL-10 und bedeutend weniger IFN- γ (siehe Abb. 4.3.3.).

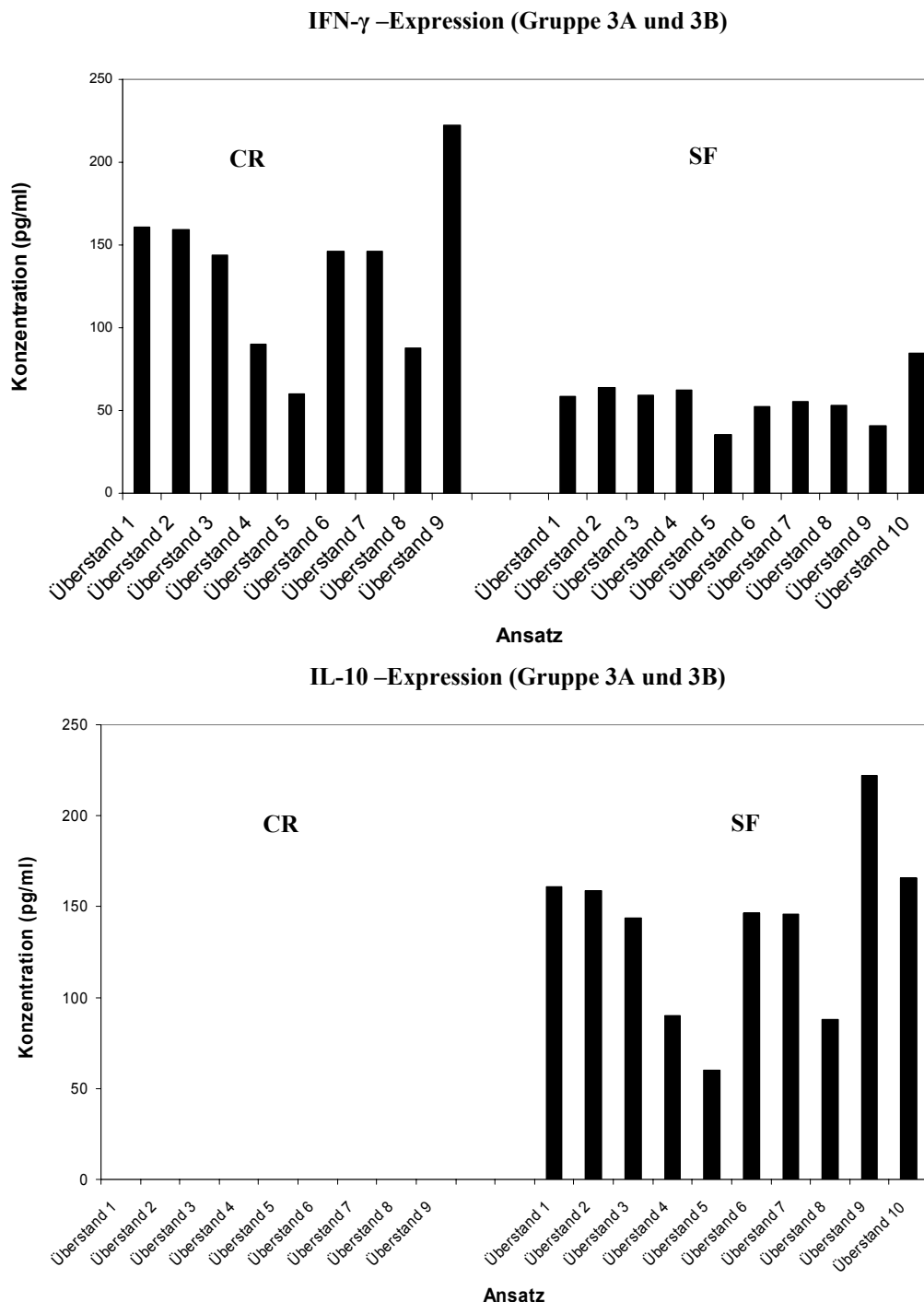


Abb. 4.3.3. Repräsentative ELISA-Untersuchungen hinsichtlich der IFN- γ und IL-10 Expression der T-Zelllinien zwei Patienten aus Gruppe 3a und 3B mit CsA und Prednisolon. Patient (links) mit chronischer Abstoßung (Serumkreatinin 1,8 mg/dl). Patient (rechts) mit stabiler Transplantatfunktion (Serumkreatinin 1,1 mg/dl). CR, chronische Abstoßung; SF, stabile Transplantatfunktion; Überstände 1-9 und 1-10, Überstände der Zellkulturen, die im Laufe der Anzüchtung der T-Zelllinien gesammelt wurden, zeitgerechte Reihenfolge. Diese Abbildung ist repräsentativ für CR: 5 von 8 Patienten, für SF: 7 von 8 Patienten.

4.4. Charakterisierung der T-Zelllinien mit Luminex

Für die wichtigsten von uns geleiteten Zytokine IFN- γ (typisch für eine Th1-Antwort) und IL-10 (typisch für eine Th2-Antwort) zeigten sich unabhängig vom Therapieregime vergleichbare Ergebnisse im Luminex-Verfahren wie im ELISA. Die etablierten T-Zelllinien aus stabilen Patienten produzierten insgesamt gesehen mehr IL-10 und die aus chronischen Patienten mehr IFN- γ . Hinsichtlich der Expression anderer Zytokine wurden vermehrt TNF- α , IL-1b, IL-2 und IL-6 bei chronischen Patienten (siehe Abb. 4.4.1.) und IL-4 und IL-5 bei stabilen Patienten beobachtet (siehe Abb. 4.4.2.).

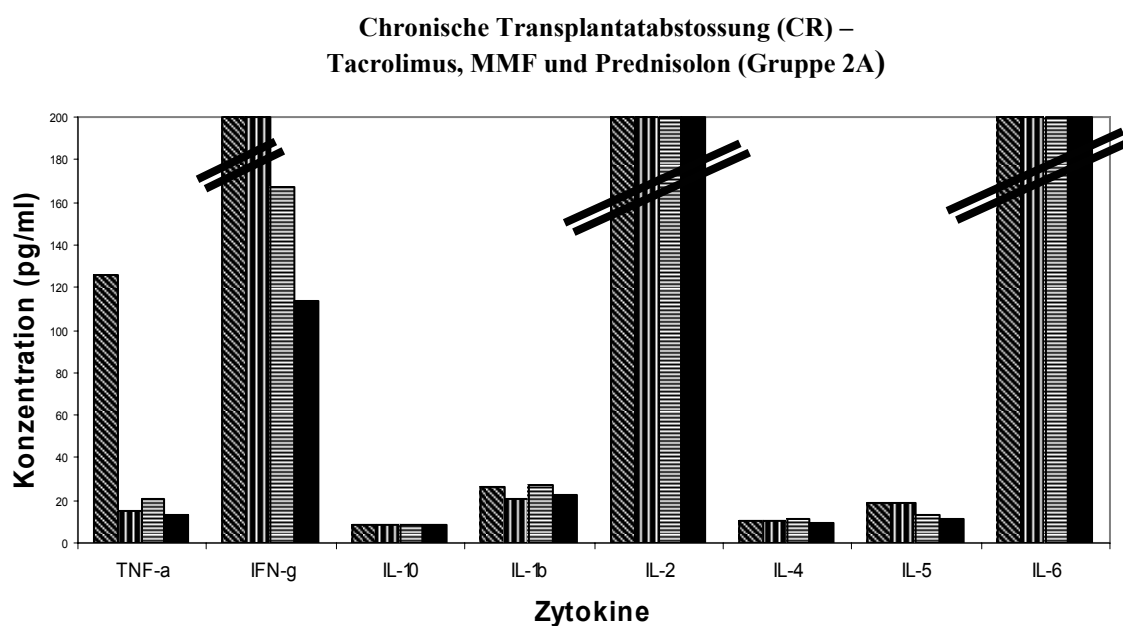


Abb. 4.4.1. Repräsentativer Luminex von Überständen der Zellkulturen eines Patienten aus Gruppe 2A mit Tacrolimus, MMF und Prednison mit CR (Serumkreatinin 2,4 mg/dl). ▨ - Überstand 1, ▩ - Überstand 2, ▨ - Überstand 3, ■ - Überstand 4; Überstände 1-4, Überstände der Zellkulturen, die im Laufe der Anzucht der T-Zelllinien gesammelt wurden, zeitgerechte Reihenfolge. Diese Abbildung ist repräsentativ für 17 von 24 Patienten mit verschiedenen Therapieregimes.

**Stabile Transplantatfunktion (SF) –
Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2B)**

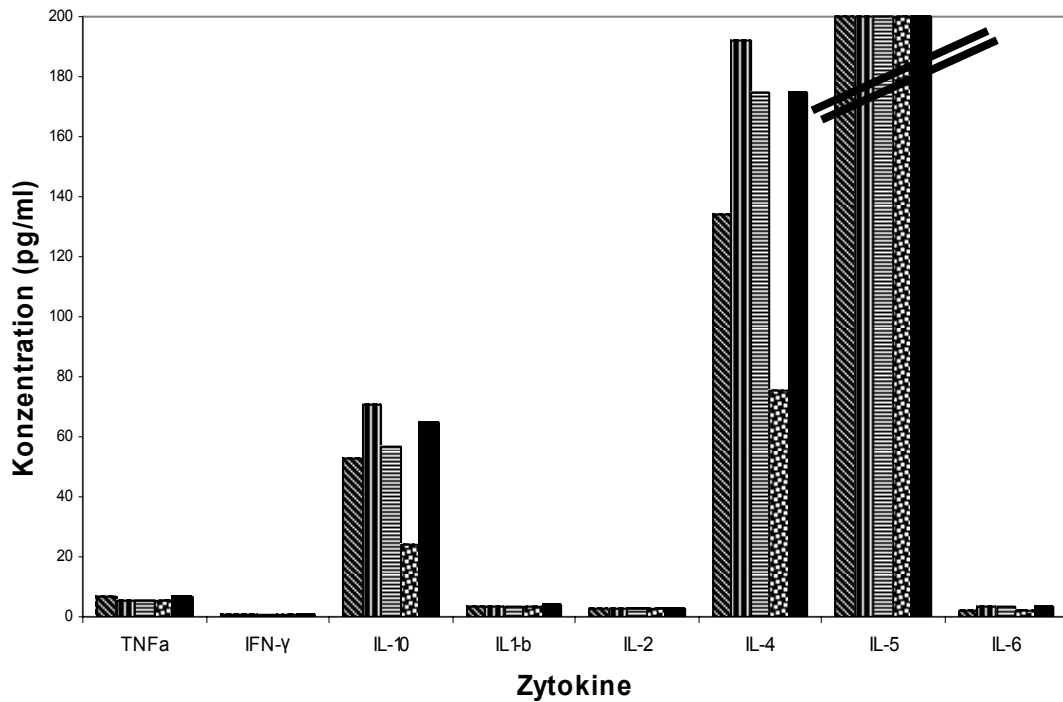


Abb. 4.4.2. Repräsentativer Luminex von Überständen der Zellkulturen eines Patienten aus Gruppe 2B mit Tacrolimus, MMF und Prednison mit SF (Creatininspiegel im Blut (Crea): 0,9 mg/dl). ▨ - Überstand 1, ▩ - Überstand 2, ▨ - Überstand 3, ▨ - Überstand 4, ▨ - Überstand 5; Überstände 1-5, Überstände der Zellkulturen, die im Laufe der Anzucht der T-Zelllinien gesammelt wurden, zeitgerechte Reihenfolge. Diese Abbildung ist repräsentativ für 19 von 24 Patienten mit verschiedenen Therapieregimes.

4.5. Analyse der Teilungsaktivität der T-Zelllinien im Proliferationsassay

4.5.1. Immunsuppression mit CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1A und 1B)

T-Zelllinien aus Patienten mit chronischer Abstoßung wiesen eine deutlich höhere Teilungsaktivität als Antwort auf die Peptidzugabe auf als die aus Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (Peptid DRB1*0701, Sequenz 1 [Aminosäuren 1-18] vs. Peptid DRB1*1501, Sequenz 5 [Aminosäuren 81-94], 12572 vs. 1956 cpm, siehe Abb. 4.5.1.1. und 4.5.1.2.).

Chronische Transplantatabstossung – CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1A)

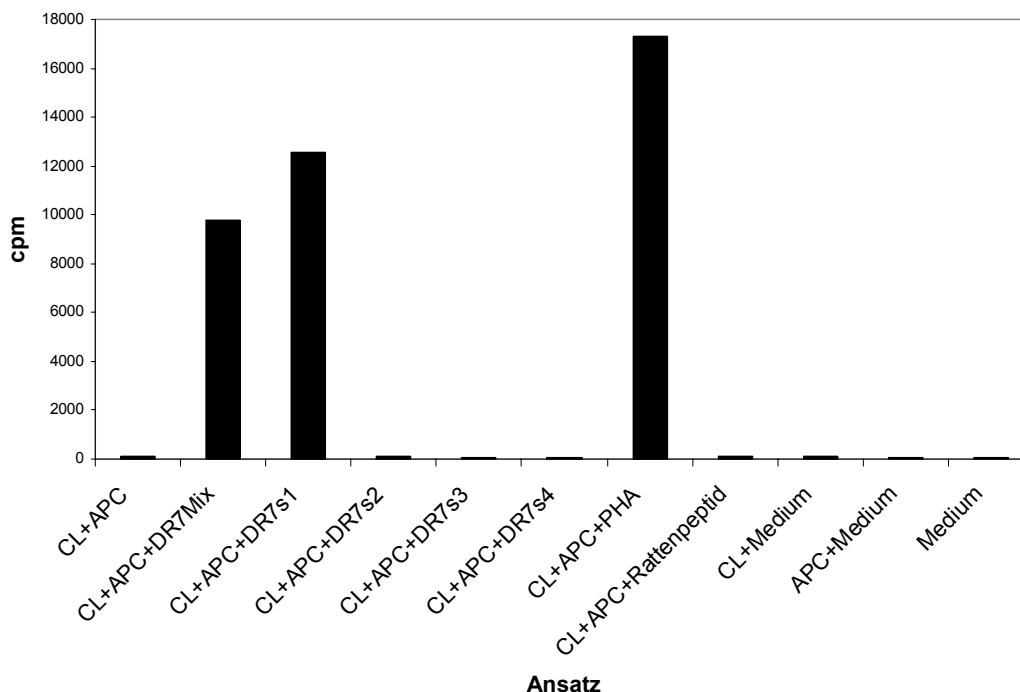


Abb. 4.5.1.1. Repräsentativer Proliferationsassay der T-Zelllinien von einem Patienten aus Gruppe 1A mit CsA, MMF und Prednisolon (Serumkreatinin 3.7 mg/dl). CL, T-Zelllinie; APC, Antigen-präsentierende Zellen; DR7, DRB1*0701; s, entsprechende Sequenz; PHA, Phytohaemagglutinin; Rattenpeptid RT1.D^uβ20-44; cpm, counts per minute (Anzahl der Ereignisse pro Minute). Diese Abbildung ist repräsentativ für 6 von 8 Patienten.

Stabile Transplantatfunktion – CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1B)

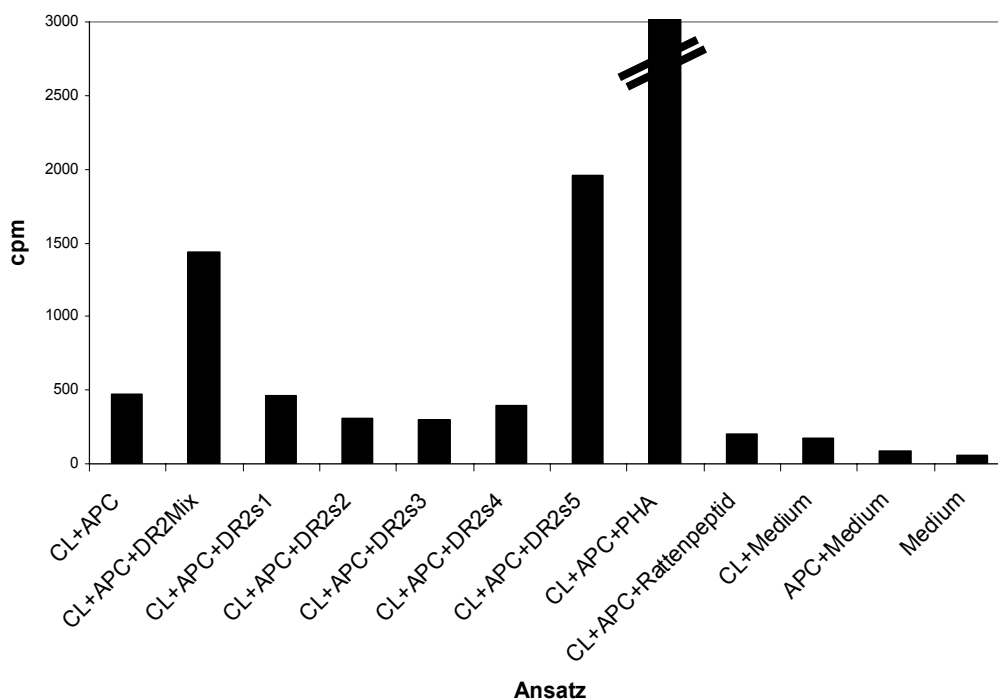


Abb. 4.5.1.2. Repräsentativer Proliferationsassay der T-Zelllinien von einem Patienten aus Gruppe 1B mit CsA, MMF und Prednisolon (Serumkreatinin 1.5 mg/dl). CL, T-Zelllinie; APC, Antigen-präsentierende Zellen; DR2, DRB1*1501; s, entsprechende Sequenz; PHA, Phytohaemagglutinin; Rattenpeptid RT1.D^uβ20-44; cpm, counts per minute (Anzahl der Ereignisse pro Minute). Diese Abbildung ist repräsentativ für 7 von 8 Patienten.

4.5.2. Immunsuppression mit Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2A und 2B)

Die T-Zelllinien aus chronischen Patienten zeigten eine deutlich höhere Proliferationsaktivität als die Zellen aus stabilen Patienten (Peptid DRB1*1501, Sequenz 2 [Aminosäuren 21-40] und 4 [Aminosäuren 61-80] vs. Peptid DRB1*1501, Sequenz 5 [Aminosäuren 81-94], 11295 und 9728 vs. 561 cpm, siehe Abb. 4.5.2.1. und 4.5.2.2.).

Chronische Transplantatabstossung – Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2A)

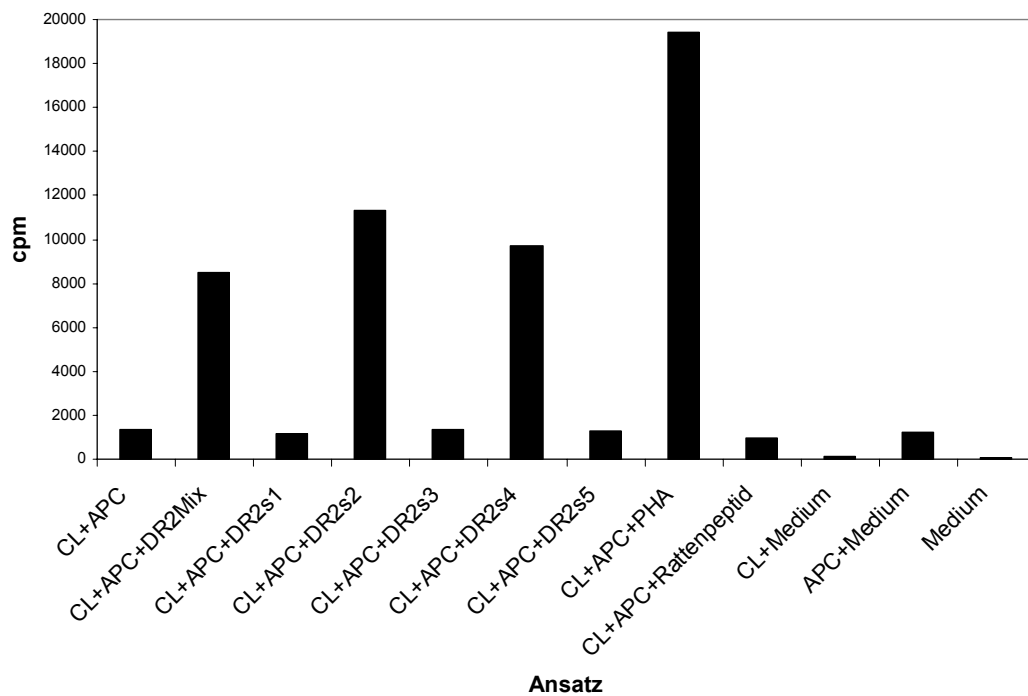


Abb. 4.5.2.2. Repräsentativer Proliferationsassay bei einem Patienten aus Gruppe 2A mit Tacrolimus, MMF und Prednisolon und Serumkreatinin 1.8 mg/dl. CL, T-Zelllinie; APC, Antigen-präsentierende Zellen; DR2, DRB1*1501; s, entsprechende Sequenz; PHA, Phytohaemagglutinin; Rattenpeptid RT1.D^β20-44; cpm, counts per minute (Anzahl der Ereignisse pro Minute). Diese Abbildung ist repräsentativ für 6 von 8 Patienten.

Stabile Transplantatfunktion – Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2B)

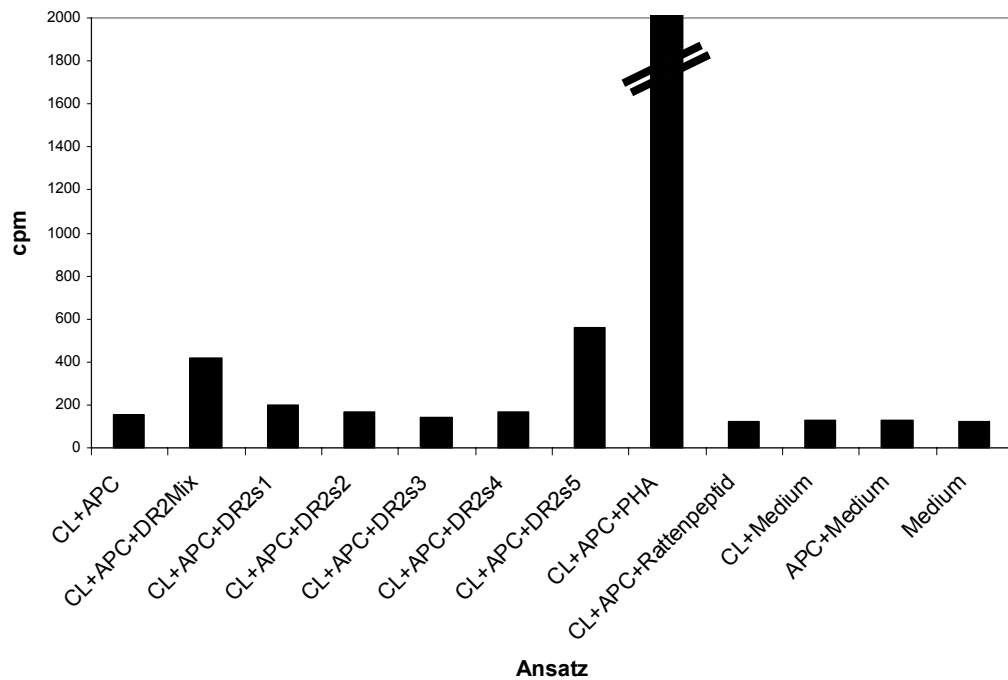


Abb. 4.5.2.2. Repräsentativer Proliferationsassay der T-Zelllinien von einem Patienten aus Gruppe 2B mit Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Serumkreatinin 1.3 mg/dl). CL, T-Zelllinie; APC, Antigen-präsentierende Zellen; DR2, DRB1*1501; s, entsprechende Sequenz; PHA, Phytohaemagglutinin; Rattenpeptid RT1.D^uβ20-44; cpm, counts per minute (Anzahl der Ereignisse pro Minute). Diese Abbildung ist repräsentativ für 6 von 8 Patienten.

4.5.3. Immunsuppression mit CsA und Prednisolon (Gruppe 3A und 3B)

T-Zelllinien aus Patienten mit chronischer Abstoßung wiesen im Vergleich zu denen aus stabilen Patienten eine höhere Proliferationskapazität (Peptid DRB1*1501, Sequenz 2 [Aminosäuren 21-40] vs. Peptid DRB1*0701, Sequenz 1 [Aminosäuren [1-18], 12439 vs. 3159 cpm, siehe Abb. 4.5.3.1. und 4.5.3.2.).

Chronische Abstossung – CsA und Prednisolon (Gruppe 3A)

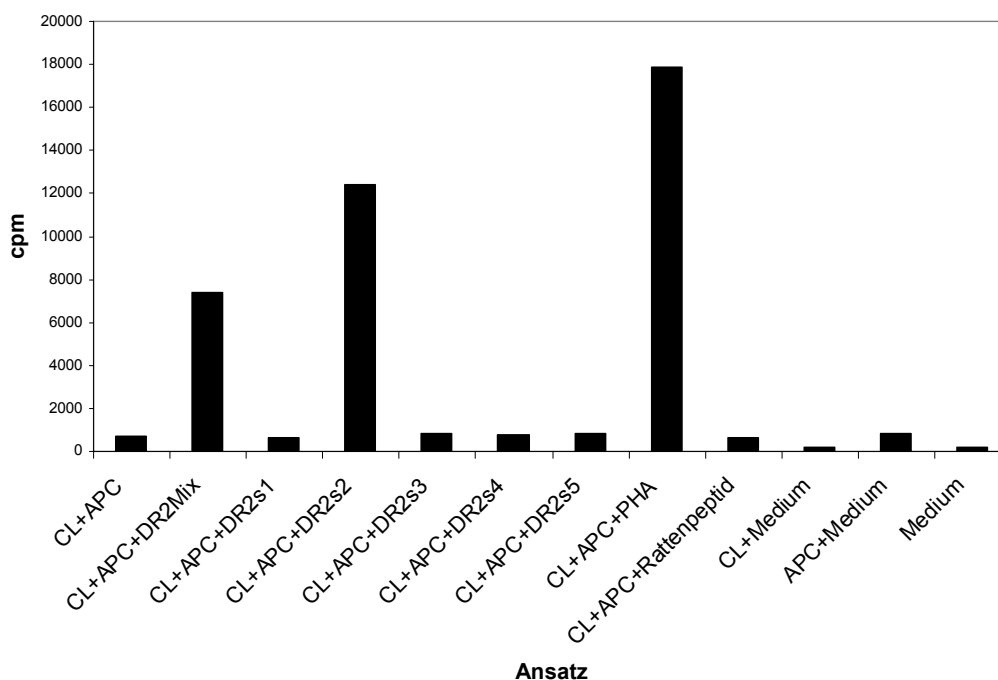


Abb. 4.5.3.1. Repräsentativer Proliferationsassay der T-Zelllinien von einem Patienten aus Gruppe 3A mit CsA und Prednisolon und Serumkreatinin 2.5 mg/dl. CL, T-Zelllinie; APC, Antigen-präsentierende Zellen; DR2, DRB1*1501; s, entsprechende Sequenz; PHA, Phytohaemagglutinin; Rattenpeptid RT1.D^β20-44; cpm - counts per minute, Anzahl der Ereignisse pro Minute. Diese Abbildung ist repräsentativ für 6 von 8 Patienten.

Stabile Transplantatfunktion – CsA und Prednisolon (Gruppe 3B)

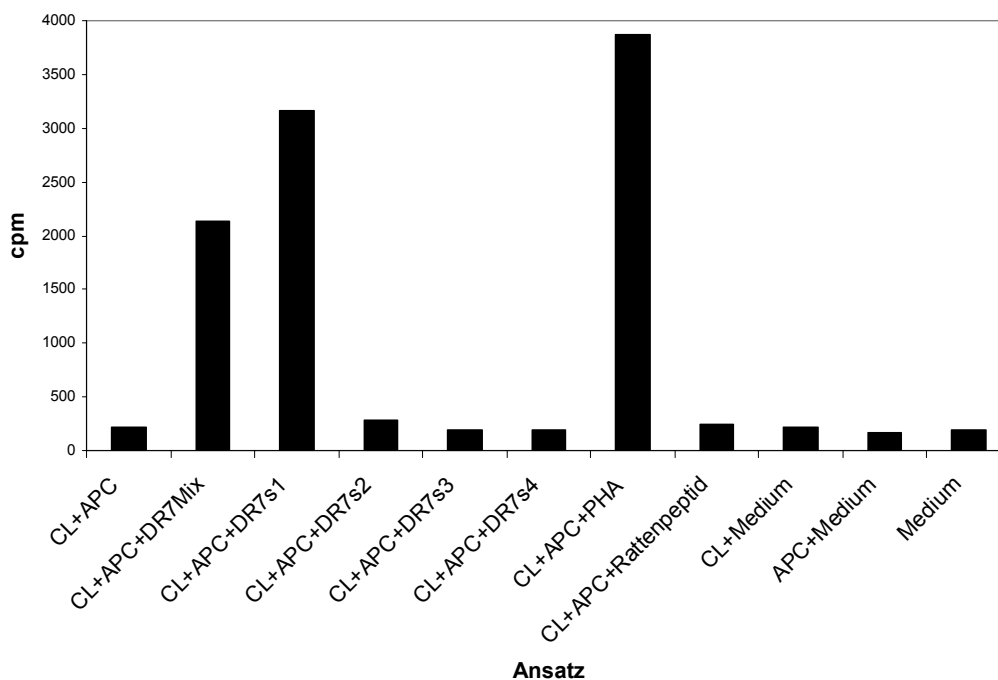


Abb. 4.5.3.2. Repräsentativer Proliferationsassay der T-Zelllinien von einem Patienten aus Gruppe 3B mit CsA und Prednisolon und Serumkreatinin 1.1 mg/dl. CL, T-Zelllinie; APC, Antigen-präsentierende Zellen; DR7, DRB1*0701; s, entsprechende Sequenz; PHA, Phytohaemagglutinin; Rattenpeptid RT1.D^β20-44; cpm, counts per minute, Anzahl der Ereignisse pro Minute. Diese Abbildung ist repräsentativ für 5 von 8 Patienten.

4.6. Charakterisierung des T-Zelltyps der T-Zelllinien

Durchflusszytometrisch sollte der prozentuale Anteil an CD3+CD8+, CD3+CD4+ und CD4+CD25+ Zellen bei Patienten der Gruppe 1 mit CsA, MMF und Prednisolon sowie der Gruppe 2 mit Tacrolimus, MMF und Prednisolon bestimmt werden.

4.6.1. CD3+CD8+ Markierung

Unabhängig vom immunsuppressiven Regime zeigten sich vergleichsweise mehr CD3+CD8+ Zellen in den T-Zelllinien von Patienten mit chronischer Abstoßung als bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (CsA, MMF und Prednisolon: 8,8% vs. 6,7%; Tac, MMF und Prednisolon: 5,9% vs. 5%, siehe Abb. 4.6.1.). Dies liegt vermutlich im Übergewicht von zytotoxischen und T-Suppressor Zellen bei chronischer Abstoßung begründet.

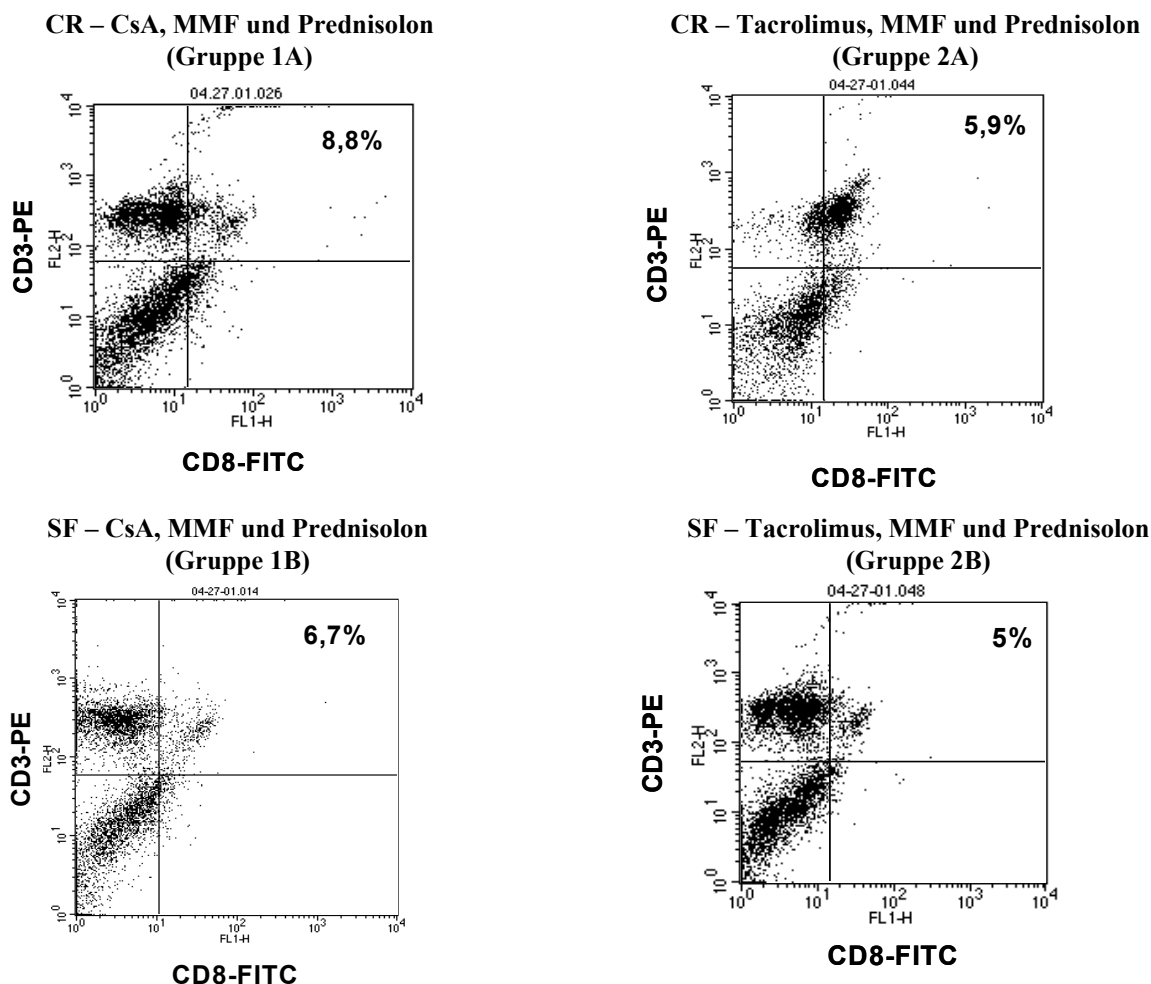


Abb. 4.6.1. Repräsentative FACS Analyse der T-Zelllinien von vier Patienten: Patient links oben – CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1A, Serumkreatinin 1,9 mg/dl); Patient links unten – CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1B, Serumkreatinin 1,2 mg/dl); Patient rechts oben – Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2A, Serumkreatinin 2,1 mg/dl); Patient rechts unten – Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2B, Serumkreatinin 0,7 mg/dl). CR, chronische Transplantatabstoßung; SF, stabile Transplantatfunktion.

4.6.2. CD3+CD4+ Markierung

T-Zelllinien aus chronischen Patienten wiesen vermehrt CD3+CD4+ Zellen im Vergleich zu denen aus stabilen Patienten auf (bei CsA, MMF und Prednisolon: 42,8% vs. 40,5%; Tac, MMF und Prednisolon: 39,9% vs. 30,2%, siehe Abb. 4.6.2.). Dies weist darauf hin, dass bei Patienten mit chronischer Abstoßung vermehrt T-Helferzell-Populationen vorkommen.

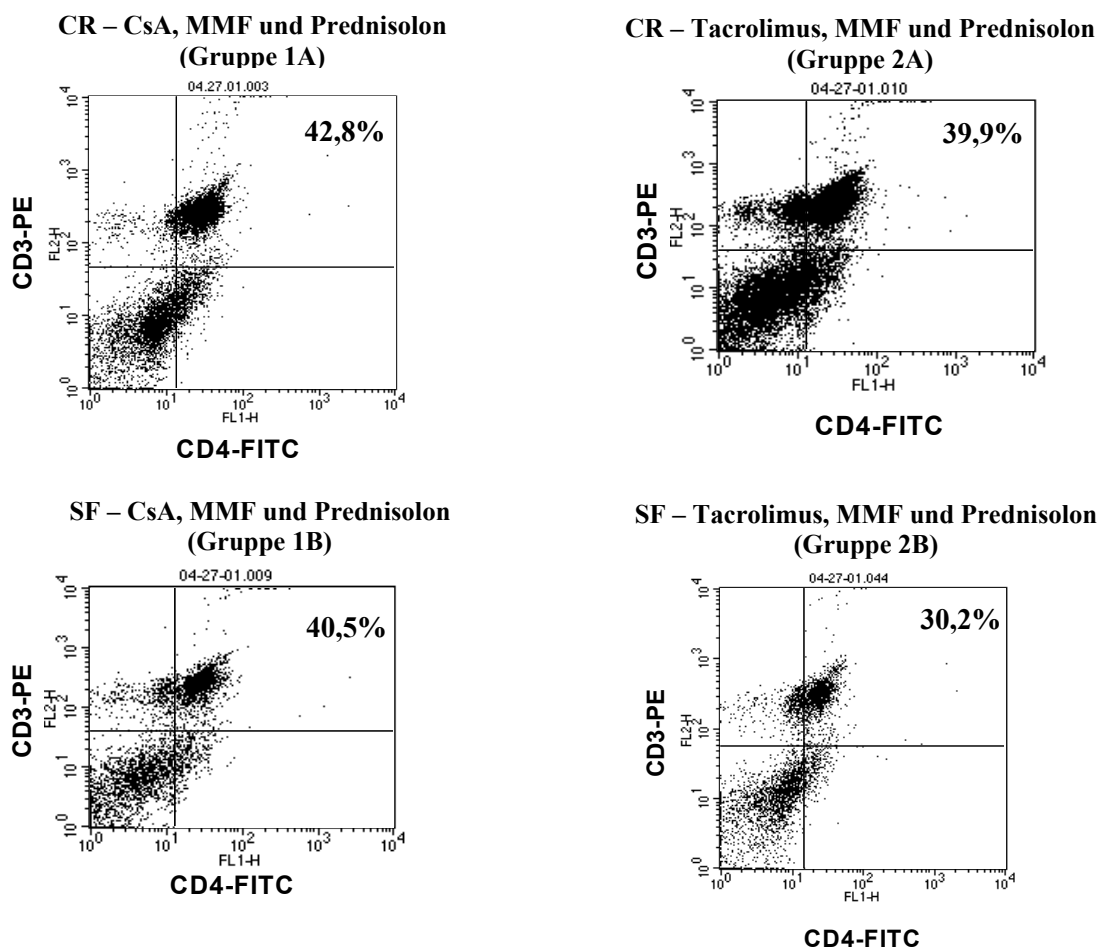


Abb. 4.6.2. Repräsentative FACS Analyse der T-Zelllinien von vier Patienten: Patient links oben – CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1A, Serumkreatinin 1,9 mg/dl); Patient links unten – CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1B, Serumkreatinin 1,2 mg/dl); Patient rechts oben – Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2A, Serumkreatinin 2,1 mg/dl); Patient rechts unten – Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2B, Serumkreatinin 0,7 mg/dl). CR, chronische Transplantatabstoßung; SF, stabile Transplantatfunktion.

4.6.3 CD4+CD25+ Markierung

Bei stabilen Patienten unter Tac, MMF und Prednisolon (Gruppe 2B) traten signifikant vermehrt CD4+CD25+ Zellen mit potentiell regulatorischen Eigenschaften auf als bei stabilen Patienten unter CsA+MMF+Pred (8,1% vs. 4,2%). Der Anteil dieser Zellen lag bei Patienten mit CR deutlich niedriger.

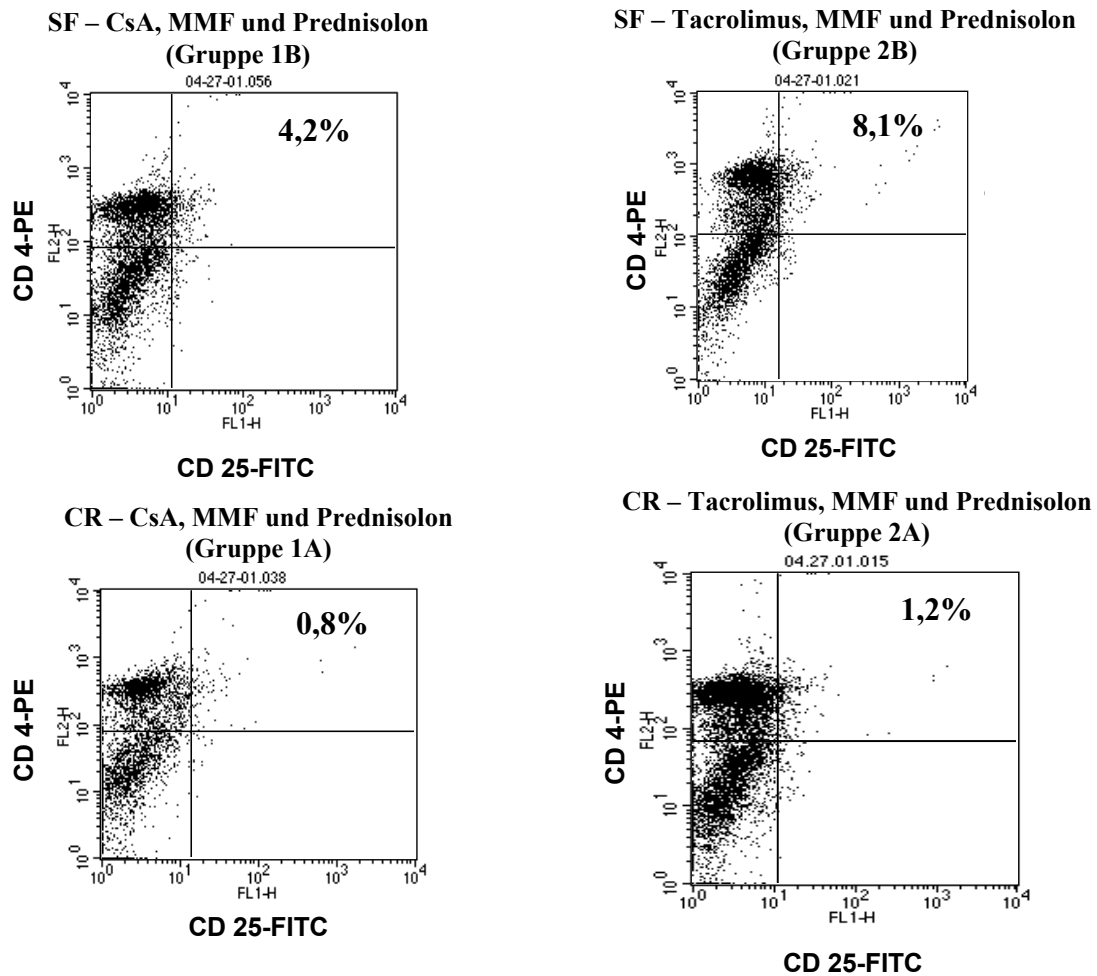


Abb. 4.6.3. Repräsentative FACS Analyse bei vier Patienten: Patient links oben – CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1B, Serumkreatinin 1,2 mg/dl); Patient links unten – CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1A, Serumkreatinin 1,9 mg/dl); Patient rechts oben – Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2B, Serumkreatinin 0,7 mg/dl); Patient rechts unten – Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2A, Serumkreatinin 2,1 mg/dl). CR, chronische Transplantatabstossung; SF, stabile Transplantatfunktion.

Zusammenfassend produzierten T-Zelllinien aus Patienten mit stabiler Transplantatfunktion überwiegend IL-10 und zeigten einen höheren Anteil an CD4+CD25+ Zellen im Vergleich zu den Patienten mit chronischer Abstoßung, welche ihrerseits eine signifikant höhere Expression an von IFN- γ aufwiesen.

In den Tabellen 4.6.1. und 4.6.2. sind die Ergebnisse der FACS Untersuchung und das Zytokinprofil von T-Zelllinien aus Patienten mit CR und SF unter CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1A und 1B) sowie unter Tacrolimus, MMF und Prednisolon (Gruppe 2A und 2B) zusammengefasst.

Tab. 4.6.1. Daten der FACS Analyse der T-Zelllinien aus Patienten mit CsA, MMF und Prednisolon. CR – chronische Abstoßung, SF – stabile Transplantatfunktion. Angabe der Zytokine in Klammern – verschwindend geringe Mengen.

Zelllinien	Phänotyp			HLA-Mismatch	Zytokinprofil
	CD3+CD4+ (%)	CD3+CD8+ (%)	CD4+CD25+(%)		
CR					
1	42,8	8,8	0,8	DR3	IFN- γ
2	37,3	8,1	0,6	DR2	IFN- γ
3	48,5	5,9	0,9	DR2	IFN- γ / IL-10
4	39,8	9,2	0,7	DR3	IFN- γ
5	38,9	7,5	1,0	DR4	IFN- γ
6	43,1	9,6	0,5	DR1	IFN- γ
7	49,0	9,0	0,8	DR1	IFN- γ / IL-10
8	41,9	6,1	0,9	DR4	IFN- γ / (IL-10)
SF					
1	40,5	6,7	4,2	DR7	IL-10 / (IFN- γ)
2	33,1	3,7	3,7	DR7	IL-10
3	29,7	5,9	4,6	DR1	IL-10 / (IFN- γ)
4	35,9	7,8	2,9	DR4	IL-10
5	41,6	5,1	4,8	DR2	IL-10
6	34,8	4,7	4,5	DR2	IL-10
7	42,0	10,1	4,6	DR1	IL-10
8	37,9	3,1	3,9	DR3	IL-10 / IFN- γ

Tab. 4.6.2. Daten der FACS Analyse der T-Zelllinien aus Patienten mit Tac, MMF und Prednisolon. CR – chronische Abstoßung, SF – stabile Transplantatfunktion. Angabe der Zytokine in Klammern – verschwindend geringe Mengen.

Zelllinien	Phänotyp			HLA-Mismatch	Zytokinprofil
	CD3+CD4+ (%)	CD3+CD8+ (%)	CD4+CD25+(%)		
CR					
1	39,9	5,9	1,2	DR1	IFN- γ / IL-10
2	35,5	10,3	1,5	DR2	IFN- γ / IL-10
3	39,1	6,4	0,8	DR2	IFN- γ
4	34,9	5,5	1,3	DR7	IFN- γ
5	34,5	6,0	1,4	DR2	IFN- γ / (IL-10)
6	37,6	3,2	1,1	DR1	IFN- γ
7	35,8	12,6	0,7	DR2	IFN- γ
8	45,7	9,5	1,0	DR3	IFN- γ
SF					
1	30,2	5,0	8,1	DR2	IL-10
2	30,9	4,1	8,4	DR1	IL-10 / IFN- γ
3	32,4	4,8	7,0	DR3	IL-10
4	24,1	5,7	8,6	DR4	IL-10
5	33,3	3,8	8,9	DR1	IL-10 / (IFN- γ)
6	26,1	3,7	8,2	DR1	IL-10
7	16,7	5,1	8,4	DR3	IL-10
8	27,4	4,9	7,5	DR2	IL-10

4.7. Charakterisierung des T-Zelltyps mittels Immunfluoreszenz (Cytospins)

4.7.1. CD4+CD8+ Färbung

In der Immunfluoreszenzfärbung fanden sich weniger CD4+ und CD8+ Zellen bei stabilen Patienten unter Tac, MMF und Prednisolon (Gruppe 2B) verglichen mit Patienten mit chronischer Abstoßung (Gruppe 2A, siehe Bilder 4.7.1.1. vs. 4.7.1.2.). Dies unterstreicht die Beobachtung, dass bei chronischer Abstoßung insgesamt mehr Lymphozyten an der T-Zellantwort beteiligt sind als bei stabiler Situation.

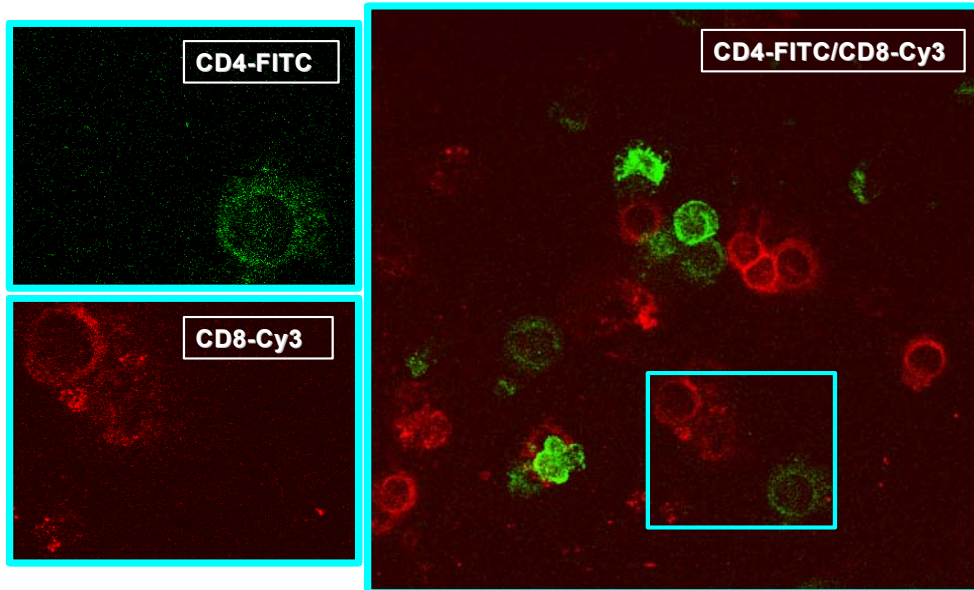


Abb. 4.7.1.1. Immunfluoreszenz von Cytospins einer T-Zelllinie eines Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (Serumkreatinin 1,2 mg/dl) unter Tac, MMF und Prednisolon. Verwendete Antikörper: CD4-FITC (grün) und CD25-Cy3 (rot). Die Abbildung ist repräsentativ für eine Versuchsreihe (n=8 Patienten).

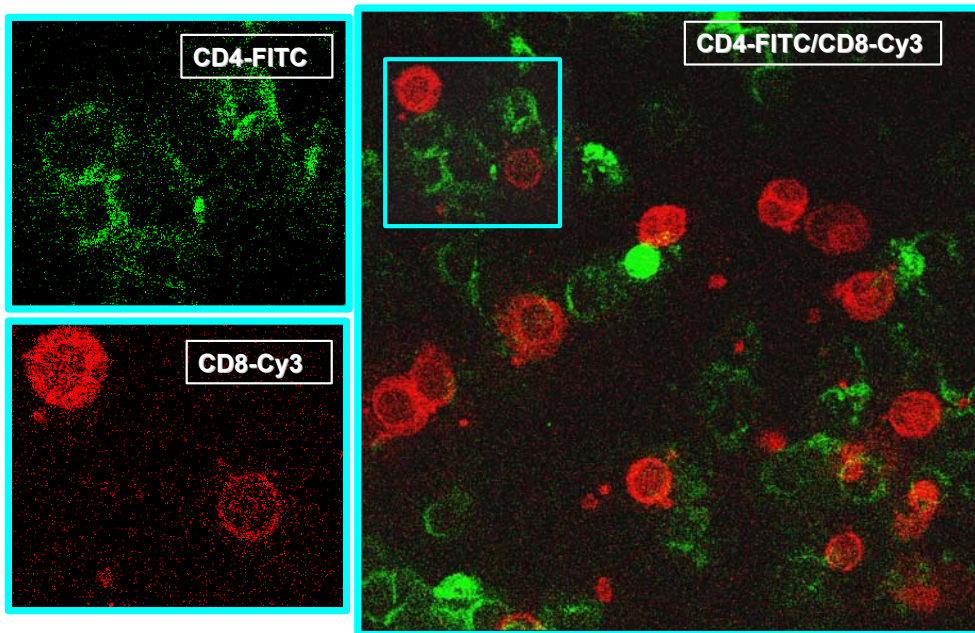


Abb. 4.7.1.2. Immunfluoreszenz von Cytospins einer T-Zelllinie eines Patienten mit chronischer Abstossung (Serumkreatinin 2,1 mg/dl) unter Tac, MMF und Prednisolon. Verwendete Antikörper: CD4-FITC (grün) und CD25-Cy3 (rot). Die Abbildung ist repräsentativ für eine Versuchsreihe.

4.7.2. CD4+CD25+ Markierung

Bei stabilen Patienten unter Tac, MMF und Prednisolon (Gruppe 2B) wurden mehr CD4+CD25+ Zellen mit potentiell regulatorischem Charakter beobachtet als bei solchen mit CsA, MMF und Prednisolon (siehe Abb. 4.7.2.1. und 4.7.2.2.).

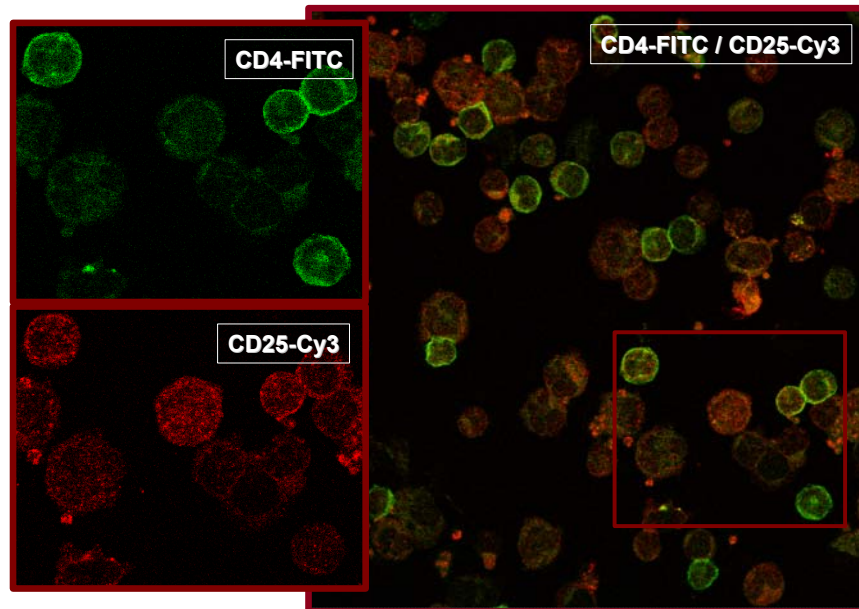


Abb. 4.7.2.1. Immunfluoreszenz von Cytospins einer T-Zelllinie eines Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (Serumkreatinin 0,9 mg/dl) unter Tac, MMF und Prednisolon. Verwendete Antikörper: CD4-FITC (grün) und CD25-Cy3 (rot). Die Abbildung ist repräsentativ für eine Versuchsreihe (n=8 Patienten).

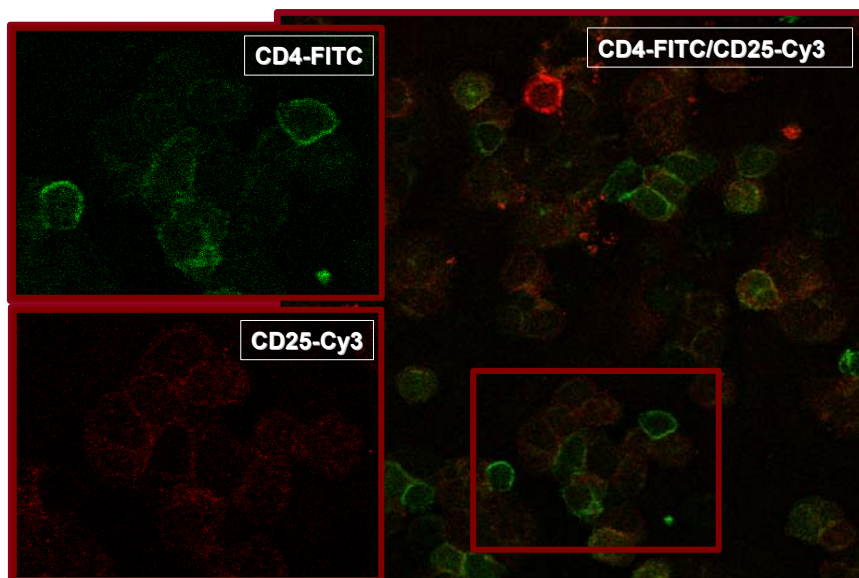


Abb. 4.7.2.2. Immunfluoreszenz von Cytospins einer T-Zelllinie eines Patienten mit chronischer Abstoßung (Serumkreatinin 2,7 mg/dl) unter CsA, MMF und Prednisolon. Verwendete Antikörper: CD4-FITC (grün) und CD25-Cy3 (rot). Die Abbildung ist repräsentativ für eine Versuchsreihe (n=8 Patienten).

Zusätzlich wurde gesehen, dass bei T-Zelllinien von chronisch abstossenden Patienten unabhängig vom Therapieregime insgesamt mehr CD4⁺ und weniger CD25⁺ T-Zellen vorkamen (siehe Abb. 4.7.3.).

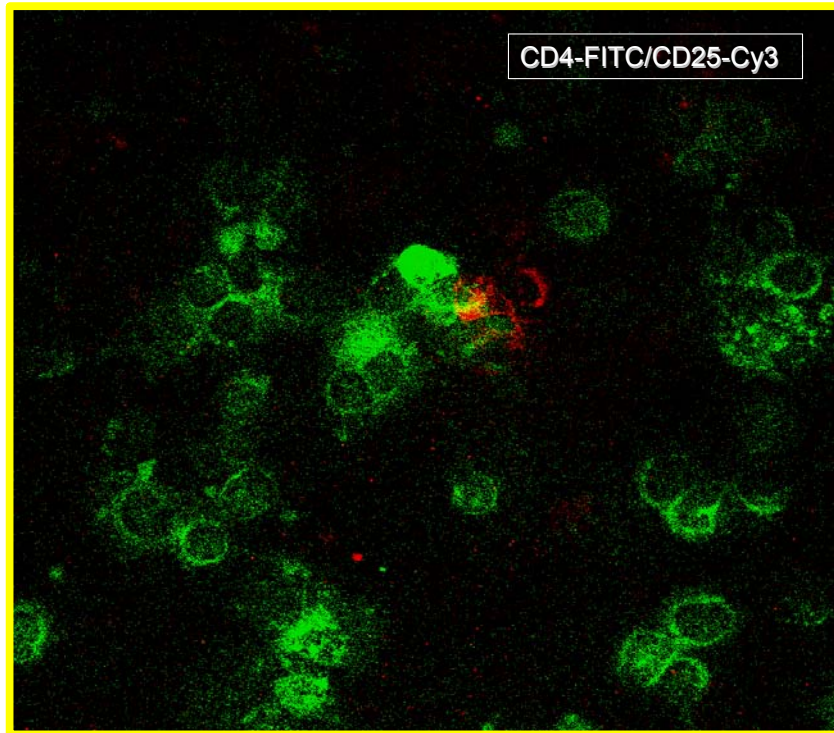


Abb. 4.7.3. Immunfluoreszenz von Cytospins eines Patienten mit chronischer Abstossung (Serumkreatinin 2,4 mg/dl) unter Tac, MMF und Prednisolon. Verwendete Antikörper: CD4-FITC (grün) und CD25-Cy3 (rot). Die Abbildung ist repräsentativ für eine Versuchsreihe (n=8 Patienten).

4.8. Analyse der Genexpression der T-Zelllinien

Durch RT-PCR und Real Time PCR sollten die Expression regulatorischer Gene in den T-Zelllinien der stabilen Patienten unter verschiedenen Protokollen analysiert werden. Die Zellen wurden hinsichtlich der Expression der Gene CD4, CD25, CTLA-4, FOXP3 und IL-10 charakterisiert.

Als Housekeeping Genes wurden GAPDH und Cyclophilin verwendet. Es wurde beobachtet, dass die Expression der regulatorischen Gene (CD4, CD25, CTLA-4, Foxp3, IL-10) bei stabilen Patienten unter Tac, MMF und Prednisolon (Gruppe 2B) höher ausfiel (1,5 bis 3,5 fach) als die von stabilen Patienten unter CsA, MMF und Prednisolon (Gruppe 1B, siehe Abb. 4.8.1.).

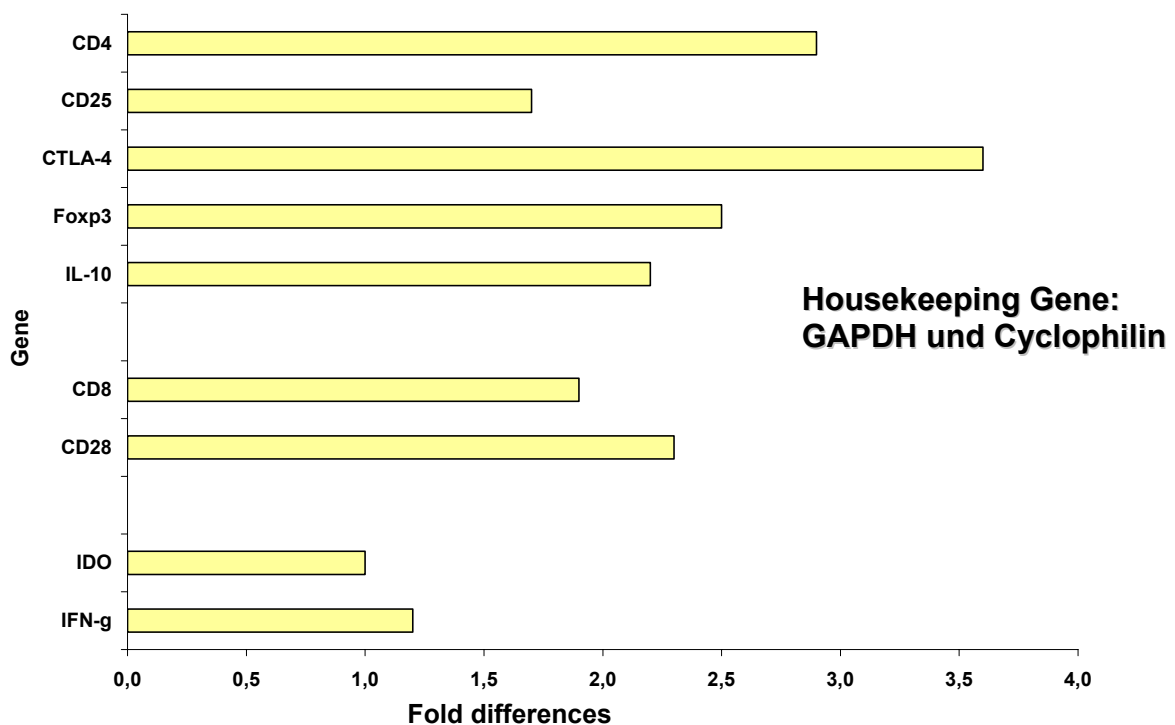


Abb. 4.8.1. Repräsentative real Time PCR Analyse der Genexpression der regulatorischen T-Zelllinien aus einem Patienten der Gruppe 2B mit Tac, MMF und Prednisolon (Serumkreatinin 1,4) im Vergleich zu einem Patienten der Gruppe 1B mit CsA, MMF und Prednisolon (Serumkreatinin 1,3 mg/dl).

4.9. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei den 107 in dieser Studie untersuchten Patienten mit diversen immunsuppressiven Protokollen fanden sich Zeichen einer unterschiedlich stark ausgeprägten chronischen Abstoßung (Tac, MMF und Prednisolon: 33,3%, CsA, MMF und Prednisolon: 55,4 % sowie CsA und Prednisolon: 62,5 %). Die funktionelle Testung der T-Zelllinien im ELISPOT

und ELISA zeigte, dass unabhängig vom Therapieregime die T-Zelllinien aus Patienten mit chronischer Abstoßung IFN- γ produzierten. Im Gegensatz dazu exprimierten die T-Zelllinien aus Patienten mit stabiler Transplantatfunktion IL-10, jedoch kaum IFN- γ . Im Luminex konnte festgestellt werden, dass in den Zelllinien aus chronischen Patienten auch die Expression weiterer repräsentativer Zytokine für die chronische Abstoßung wie TNF- α , IL-1b, IL-2 und IL-6 höher war als bei den Patienten mit stabiler Transplantatfunktion, die ihrerseits mehr IL-4 und IL-5 produzierten. Mit Hilfe des Proliferationsassays wurde beobachtet, dass die T-Zelllinien aus chronischen Patienten eine vergleichsweise grössere Proliferationsaktivität als Antwort auf die spezifische Peptidzugabe aufwiesen als die Zellen aus stabilen Patienten. Diese zeigte sich übereinstimmend bei allen Therapieregimes. In der Gruppe stabiler Patienten mit Tac, MMF und Prednisolon wurden insgesamt weniger CD4⁺ und CD8⁺ Zellen durchflusszytometrisch und immunfluoreszenzhistologisch gesehen als bei solchen mit chronischer Abstoßung, was eine Indiz dafür ist, dass während einer Abstoßung viele T-Zellen des Immunsystems rekrutiert werden. Ausserdem wurden vermehrt CD4⁺CD25⁺ Zellen mit regulatorischem Charakter bei stabilen Patienten mit Tac, MMF und Prednisolon im Vergleich zu denen mit CsA, MMF und Prednisolon beobachtet. Es bestand kein signifikanter Unterschied im Anteil regulatorischer T-Zellen zwischen den Patienten mit durchgeführter ATG-Induktionstherapie und denen ohne dieses anti-T-Zell-Immunglobulinpräparat.

5. Diskussion

5.1. Klinische immunsuppressive Protokolle

Organtransplantationen werden heutzutage als kausale Therapie bei terminalem Organversagen durchgeführt. Bis zur Mitte des letzten Jahrhunderts war es aufgrund vielfältiger Probleme technischer und immunologischer Natur unmöglich, die Idee der Organtransplantationen von einem Mensch zum anderen zu verwirklichen. Erst mit der Einführung neuer chirurgischer Techniken und Entwicklung wirksamer immunsuppressiver Therapien zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion durch das Immunsystem gelang es schliesslich Organe wie die Niere, das Herz, die Leber, die Lunge sowie den Darm erfolgreich zu transplantieren. Heutzutage existieren verschiedene immunsuppressive Medikamente, die nicht nur bei transplantierten Patienten, sondern auch bei Patienten mit Autoimmunkrankheiten oder anderen Systemerkrankungen eingesetzt werden. In unserer Studie wurden nierentransplantierte Patienten unter dem Aspekt der Anwendung unterschiedlicher immunsuppressiver Medikation untersucht. In den Kliniken werden verschiedene Kombinationen der Präparate eingesetzt, wobei die meisten eingesetzten Protokolle bei der Nierentransplantation zur Zeit CsA und der Tacrolimus in Kombination MMF und Prednisolon sind. Früher war Azathioprin anstelle von MMF beinhaltet.

Besonderes Interesse erregt das Präparat MMF. Diese Substanz findet in letzter Zeit eine immer breitere Anwendung in der immunsuppressiven Therapie der Patienten nach Nierentransplantation. MMF ist ein Prodrug, das im Magen und im Dünndarm zum aktiven Metaboliten Mykofenolsäure (MPA) hydrolytisch gespalten wird. MPA ist ein nichtkompetitiver, selektiver und reversibler Inhibitor der Monophosphat-Dehydrogenase, einem Enzym, das die de-novo Purinsynthese hemmt. Dies führt zu einer reversiblen Inhibition der Replikation der T- und B-Lymphozyten, zur Hemmung der Glukosylierung der Adhäsionsmoleküle, zur Blockierung der Produktion von allospezifischen Antikörpern und zu einer modifizierten Zytokinproduktion. MPA wird dann in ein stabiles Phenolisches Glukuronid verwandelt, welches pharmakologisch nicht mehr aktiv ist. Wie einige Studien gezeigt haben, sollte MMF weniger Nebenwirkungen haben als Cyclosporin (30, 31), Tacrolimus (32) und andere Immunsuppressiva und mit einem prolongierten Überleben des Transplantates einhergehen (33-35). Damit spricht dieses Medikament in der Zukunft für eine perspektivreiche Anwendung. Die meisten Kliniken, die zuvor Azathioprin verwendet haben, änderten ihre Protokolle auf MMF (36). Die Frage der Nebenwirkungen der Immunsuppressiva spielt heutzutage eine sehr bedeutende Rolle. So steht beim CsA die

Nephrotoxizität, beim Tacrolimus der Diabetes mellitus und beim MMF gastrointestinale Nebenwirkungen im Vordergrund des Nebenwirkungsspektrums (37). Aber auch Probleme einer Leukopenie, Anämie, Hyperlipidämie und Hypertonie sind in diesem Zusammenhang zu nennen. Bei Unterdosierung kommt es zur Ausbildung einer Abstoßung und bei zu hoher Dosierung zu den genannten unerwünschten Nebenwirkungen (38-40) sowie zum Auftreten opportunistischer Infektionen. Solche komplizierenden Begleiterkrankungen werden durch diverse Viren, wie z.B. Polyoma BK Virus, Cytomegalie Virus, West Nile Virus (41-43) oder auch durch Pilze wie *Cryptococcus albidus* (44) hervorgerufen. Ausserdem steigt bei immunsupprimierten Patienten das Risiko, Malignome, wie z.B. lymphoproliferative Erkrankungen (45), akute myeloische Leukämie (46) und andere solide Tumoren (47), auszubilden. Das Ziel einer immunsuppressiven Therapie stellt daher die Unterdrückung der allospezifischen Immunantwort gegen das Transplantat bei möglichst erhaltener allgemeiner Immunabwehr sowie gleichzeitig niedrigem Nebenwirkungsspektrum dar.

Die Vorteile eines Protokolls gegenüber einem anderen sind somit hinsichtlich ihrer Unterdrückung der Abstoßung zu überprüfen. Dieses erfolgt klinisch durch objektive Parameter wie das Serumkreatinin, Serumharnstoff, die glomeruläre Filtrationsrate und den Proteinverlust im Urin. Bei Fragen zu einer akuten und chronischen Abstoßung wird darüber hinaus in bestimmten Fällen im klinischen Alltag eine Probebiopsie aus der Transplantatiere entnommen. Aus immunologischer Sicht könnte die An- oder Abwesenheit der Empfänger-T-Zellreaktivität gegen relevante spenderspezifische Antigene zu definierten Zeitpunkten nach Transplantation *in vitro* überprüft werden. Daraus liesse sich, wie bereits erste Untersuchungen hierzu zeigten (48), unter Umständen ableiten, ob eine T-Zellimmunantwort unter einem bestimmten immunsuppressiven Protokoll *in vivo* stattfindet oder nicht.

In dieser Studie wurden 107 Patienten aus dem Gesamtpool von 630 nierentransplantierten Patienten ausgewählt, die mit einer der drei Therapiekombinationen behandelt wurden und sich entweder in einem Stadium der chronischen Abstoßung befanden oder eine stabile Transplantatfunktion aufwiesen. Nach der Subgruppen-Analyse fand sich je nach Behandlungsschema unterschiedlicher Anteil an Patienten mit chronischer Abstoßung (Tac, MMF und Prednisolon 33,3%, CsA, MMF und Prednisolon 55,4% sowie CsA und Prednisolon 62,5%).

Aufgrund des geringen Anteils an Patienten mit chronischer Abstoßung erregte demnach besonders die Patientengruppe 2 mit Tacrolimus- und MMF-basierter Immunsuppression hinsichtlich einer genauen Analyse besonderes Interesse. Diese Triple-Therapie findet zu-

nehmend klinisches Interesse (49). Das Ziel dieser Studie war es, die Patienten dieser Gruppe im Vergleich zu denen der weiteren Subgruppen näher zu charakterisieren und zu vergleichen.

5.2. Charakterisierung der T-Zelllinien

Der indirekte Weg der Alloantigenerkennung hat, wie einige Studien zeigten bei der Immunpathogenese der chronischen Transplantatabstoßung eine besondere Bedeutung (50). Die im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* durchgeführten T-Zell-Untersuchungen wurden auf der Basis dieses indirekten Weges etabliert. Somit wurde die zum Zeitpunkt der Ausbildung der chronischen Abstoßung oder aber der stabilen Transplantatfunktion *in vivo* vorliegende Situation nachempfunden. Die Etablierung von T-Zelllinien erlaubt bei ausreichend propagierter T-Zellzahl im Reagenzglas den Vorteil eines unabhängigen Vergleichs der Verhältnisse der einzelnen T-Zellpopulationen miteinander und damit Rückschlüsse auf die Situation *in vivo*. B-Lymphozyten und Monozyten, die bei der Gewinnung der peripheren Blutlymphozyten in Zellkulturen zunächst enthalten sind, gehen unter diesen Kulturbedingungen zugrunde. Das Verfahren der Etablierung von T-Zelllinien erlaubt es, die Zellzahl der T-Lymphozyten zu vergrößern, ohne dass dadurch die Anteile der jeweiligen Subpopulationen wesentlich verändert werden. Nach deren Etablierung aus den peripheren Blutlymphozyten wurde die Spezifität der Zelllinien gegenüber ihrem jeweiligen Spenderpeptid überprüft. Im Proliferationsassay wiesen die Zelllinien signifikante und spezifische Reaktivitäten gegenüber ihrem Spender-Peptid auf. Die Reaktivität der T-Zelllinien aus chronischen Patienten war deutlich ausgeprägter als aus stabilen Patienten. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Zellen aus chronischen Patienten *in vivo* ebenso einer höheren Proliferation unterliegen als die aus stabilen Patienten. Durchflusszytometrisch zeigte sich, dass der Anteil an CD4+CD25+ Zellen mit potentiell regulatorischen Eigenschaften bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion höher war als bei chronischen Patienten. Dieses könnte auf ihre Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der funktionellen Transplantattoleranz hinweisen. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen überein, in denen die besondere Rolle der CD4+CD25+ T-Zellen bei Ausbildung der Toleranz sowohl im Menschen (51) als auch in experimentellen Modellen aufgezeigt wurde (52-55). Ferner wurde erstmals beobachtet, dass unter den stabilen Patienten unter Tacrolimus, MMF und Prednisolon Therapie der Anteil der CD4+CD25+ Zellen wiederum höher war als unter stabilen Patienten mit CsA, MMF und Prednisolon Behandlung. Dieses wurde anschliessend auch immunhistochemisch nachgeprüft und bestätigt. Diese Beobachtung

könnte auf den vergleichsweise grössten protektiven Effekt eines auf Tacrolimus basierten Protokolls auf potentiell regulatorische T-Zellen hinweisen, was eine kausale Rolle bei einer funktionellen Transplantattoleranz spielen. Es gibt wenige klinische Studien, die die Vorteile dieses Protokolls auf das langzeitige Transplantatüberleben und die unbeeinflusste Nierenfunktion in diesem Zusammenhang zeigten (56). Über die beobachteten Nebenwirkungen unter diesem Protokoll wurde berichtet (39), wobei sich nicht alle initial vermuteten Nebeneffekte in retrospektiven klinischen Analysen bestätigt haben (57). Insgesamt gesehen erscheinen diese Beobachtungen von besonderem klinischem Interesse, da sie ein Schlüssel zur Entwicklung von Therapieprotokollen sein können, die insbesondere die körpereigenen Mechanismen einer potentiellen Toleranzentwicklung nicht unterdrücken und die Proliferation und Funktion regulatorischer T-Zellen eher fördern. Eine auf Tacrolimus und MMF basierte Immunsuppression scheint somit die Ausbildung der Transplantattoleranz weniger zu beeinträchtigen und regulatorische Zellen zu fördern. Diese Schlussfolgerung würde die Meinung unterstützen, die den Einsatz von Tacrolimus gegenüber CsA favorisiert (58, 59). Eine interessante Beobachtung war in diesem Zusammenhang die deutlich geringere Zellzahl an CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in den Zelllinien aus stabilen Patienten. Dieses lässt auf eine höhere Aktivität der T-Zellen bei chronischen Patienten im Vergleich zu stabilen Patienten schliessen. Die im Weiteren analysierten Zytokine der T-Zelllinien zeigten ein typisches Th1- oder Th2-gerichtetes Zytokinmuster. Nach gegenwärtiger Auffassung ist die Transplantatabstoßung mit einer verstärkten Aktivität von Th1-Zellen und die Organakzeptanz bzw. -toleranz mit einer Th2-Antwort und Zytokinmuster verbunden (60, 61). Chronische Patienten müssten demnach höhere Konzentrationen an Th1-typischen Zytokinen aufweisen, stabile Patienten dagegen ein Th2-typisches Zytokinmuster zeigen. Mittels ELISPOT sollte die Zytokinantwort der T-Zelllinien auf die Zugabe der Peptide und der antigenpräsentierenden Zellen untersucht werden. Diese Methode ergibt einen Hinweis auf die Art dieser T-Zelllinien. Mittlerweile gibt es Ansätze, dieses Verfahren zum immunologischen Monitoring des Immunstatus gegenüber dem transplantierten Organ zu machen (62). Allgemein gilt, dass Th1-Zellen, die für die Abstoßung des Transplantates verantwortlich gemacht werden, hauptsächlich IFN- γ und IL-2 exprimieren, während Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren. Verschiedene Arbeiten bestätigen mittlerweile die Beobachtung, dass die T-Zelllinien aus Patienten mit der chronischen Abstoßung zum grössten Teil IFN- γ produzieren (62-64) und solche aus Patienten mit stabiler Transplantatfunktion IL-10-assoziert sind (65-67). Es existieren hierzu jedoch kontroverse Studien, die zeigen, dass IL-10 mit einer akuten Abstoßung einhergeht (68,

69) während IFN- γ eher als Schutzfaktor gegenüber dem Transplantat fungiert (70). In den eigenen ELISPOT-Analysen wurde dazu beobachtet, dass die T-Zelllinien aus chronischen Patienten nur geringfügig IL-10 produzierten, jedoch deutlich IFN- γ exprimierten. Dagegen produzierten T-Zelllinien aus stabilen Patienten wenig IFN- γ , jedoch deutlich IL-10. Die Stärke der Zytokinexpression liess dabei auf die jeweilige Dominanz bestimmter getesteter DR-Peptid-Sequenzen schliessen. Insgesamt korrelieren die Ergebnisse unserer ELISPOT-Untersuchungen mit den Studien, die IL-10 mit einer stabilen Transplantatfunktion und IFN- γ mit einer Abstoßung des Transplantates und Aktivierung der gegen das Organ gerichteten Immunreaktion in Verbindung brachten. Mit ELISA wurden die Zytokine IFN- γ und IL-10 in den Kulturüberständen, die im Laufe der Etablierung der T-Zelllinien gesammelt wurden, jeweils einzeln gemessen. Die Ergebnisse waren vergleichbar denen des ELISPOT Verfahrens. Patienten mit stabiler Transplantatfunktion wiesen unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll in den Kulturüberständen sowohl IFN- γ als auch IL-10 auf, während T-Zelllinien aus Patienten mit chronischer Transplantatabstoßung fast ausschliesslich IFN- γ produzierten. Bezüglich der Menge an TGF- β lässt sich keine klare Aussage treffen. Dieses Zytokin wurde in ähnlichem Maße sowohl bei stabilen als auch abstossenden Patienten beobachtet. Wir konnten damit nicht eindeutig die Ergebnisse anderer Studien bestätigen, die TGF- β als ein Zytokin mit eher regulatorischer Funktion gesehen haben (65, 71, 72). Dieses sollte dann in stärkerem Masse bei stabilen Patienten exprimiert werden. Andererseits könnte es aber ein profibrogenes und abstoßungsförderndes Zytokin sein (73), dass bei Patienten mit chronischer Abstoßung vorrangig vorzufinden wäre. Die Daten korrelieren mit den Ergebnissen anderer Gruppen bezüglich der Zuordnung der Th1- und Th2-gerichteten Zytokine zur jeweils vorliegenden Abstoßung oder Transplantatakzeptanz. Als letztes sollten die T-Zelllinien auf der DNA-Ebene charakterisiert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression der regulatorischen Genprodukte CD4, CD25, CTLA-4, Foxp3 und IL-10, die, wie andere Studien postulieren, essenziell für die Ausübung der Funktionen der regulatorischen T-Zellen sind (74-76), bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion unter Tacrolimus und MMF eineinhalb bis dreifach stärker exprimiert wurden als es bei denen unter CsA und MMF der Fall war. Dies sagt aus, dass der Anteil an regulatorischen Zellen im Blut bei Patienten unter Tacrolimus und MMF grösser ist als unter CsA und MMF, die Beobachtung, welche die bisherigen Annahmen bezüglich dieser Protokolle bestätigt. Bemerkenswert erscheint die Tatsache, dass der Anteil der regulatorischen T-Zellen unabhängig davon war, ob bei einem Patienten eine Induktionstherapie mit ATG durchgeführt wurde oder nicht.

Somit hat die Etablierung der T-Zelllinien und ihre Charakterisierung erstmals gezeigt, dass die immunsuppressive Kombination aus Tacrolimus, MMF und Prednisolon ein Therapieregime ist, welches relativ wenig Nebeneffekte aufweist und die Ausbildung regulatorischer T-Zellen begünstigt. Diese Medikation stellt damit eine aussichtsreiche Perspektive für die Zukunft dar, weil sie mit relativ geringer Dosis und somit relativ nebenwirkungsarm die Ausbildung und Erhaltung der funktionellen Transplantattoleranz bei nierentransplantierten Patienten fördert.

6. Beantwortung der Fragen

6.1. Ist die vergleichende Analyse etablierter T-Zelllinien geeignet, eine Aussage zum Status der Patienten hinsichtlich einer stabilen Transplantatfunktion oder aber einer sich ausbildenden chronischen immunologischen Abstoßung zu treffen?

Die eigentliche Methode der Etablierung der T-Zelllinien erlaubt es, die Situation im Körper *in vivo* nachzuahmen. Durch die Methodik der Kultivierung der Zellkulturen und ihre Stimulation werden nur die Zellen gezüchtet, die für die Abstoßung bzw. für die stabile Transplantatfunktion verantwortlich gemacht werden, nämlich Subpopulationen der T-Lymphozyten. Die Verhältnisse der Mengen an diesen Zellen bleiben durch die Kultivierung beibehalten. Deswegen erlaubt uns die Etablierung der T-Zelllinien und ihre Analyse das Monitoring des Transplantatzustandes auf zellulärer Ebene.

6.2. Sind mit den etablierten T-Zelllinien immunregulatorische Zellen in Patienten nachzuweisen?

Durch die Charakterisierung der Zellen mittels verschiedenen Verfahren konnten die T-Lymphozyten mit CD4+CD25+ Phänotyp, IL-10 Expression und erhöhter Aktivität immunregulatorischer Gene nachgewiesen werden. Diesen Zellen wird allgemein die regulatorische Funktion und Induktion der Transplantattoleranz zugeschrieben.

6.3. Welches Protokoll eignet sich am besten zur Vermeidung der chronischen Abstoßung?

Die statistische Analyse des Transplantatzustandes der Patienten unter verschiedenen immunsuppressiven Protokollen hat gezeigt, dass die wenigsten Fälle des Auftretens der chronischen Abstoßung bei solchen Patienten auftraten, die Tacrolimus, MMF und Prednison als immunsuppressives Regime erhalten haben. Ausserdem wurden in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten gesehen, dass der grösste Anteil der T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften mit dem Phänotyp CD4+CD25+ gerade bei dieser therapeutischen Kombination zu finden war. Anhand dieser Tatsache lässt sich vermuten, dass sich dieses therapeutische Regime zur Vermeidung der chronischen Abstoßung am besten eignen könnte.

6.4. Welchen Einfluss haben die analysierten immunsuppressiven Therapieprotokolle auf das transplantatspezifische T-Zellrepertoire in den untersuchten Patienten?

Die verschiedenen immunsuppressiven Protokolle beeinflussen das T-Zellrepertoire in unterschiedlichem Maße. An den Ergebnissen der durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurde gesehen, dass der grösste Anteil an CD4+CD25+ Zellen, denen die regulatorischen Fähigkeiten zugeschrieben werden, bei den Patienten vorkam, die Tacrolimus plus MMF plus Prednisolon als Immunsuppression bekommen haben. Bei den anderen Regimes, nämlich CsA plus MMF plus Prednisolon und CsA plus Prednisolon, war die Menge dieser Zellen viel kleiner. Somit scheint gerade die immunsuppressive Therapie Tacrolimus plus MMF plus Prednisolon am besten die Ausbildung der regulatorischen T-Zellen zu fördern und damit die Induktion der Transplantattoleranz besonders günstig zu beeinflussen. Dies könnte bedeuten, dass diese Medikation aufgrund des unter ihr höher ausgebildeten Anteils an CD4+CD25+ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften schneller in ihrer Dosis reduziert werden kann, um damit weitere Nebenwirkungen der Immunsuppression zu vermeiden.

7. Zusammenfassung

Heutzutage existieren verschiedene immunsuppressive Protokolle, die bei Patienten nach Nierentransplantation mit dem Ziel der Unterdrückung der immunologischen Abstoßungsreaktion eingesetzt werden. Welche von diesen Protokollen aber seine Aufgabe am besten verwirklicht, ist bis jetzt noch offen geblieben. Das relativ neue Präparat MMF findet zunehmend im klinischen Alltag im Rahmen dieser Therapie seine Verwendung. In dieser Arbeit wurden die Funktionen regulatorischer T-Zellen aus Patienten nach Nierentransplantationen unter MMF basierter Immunsuppression untersucht. Sie wurden mit Hilfe verschiedener Verfahren mit dem Ziel charakterisiert, die günstigste immunsuppressive Kombination zu finden und ihre Wirkungen auf zellulärer Ebene zu analysieren. Insgesamt wurde festgestellt, dass die T-Zelllinien aus Patienten mit chronischer Abstoßung vom Th1-Zytokin-Profil und die aus stabilen Patienten vom Th2-Muster geprägt waren. Dies verdeutlicht die Rolle der Th1-Zellen bei der Induktion und Aufrechterhaltung der chronischen Abstoßung und die immunregulatorischen Eigenschaften der Th2-Zellen. Alle T-Zelllinien wiesen Spender-Peptid spezifische und signifikante Proliferationsaktivität, wobei die Antwort bei den Zelllinien aus chronischen Patienten viel höher ausfiel. Diese Tatsache weist auf die besondere immunologische Aktivität der Th1-Zellen. Unter den T-Zelllinien aus stabilen Patienten unter Tacrolimus, MMF und Prednisolon wurden viel mehr CD4+CD25+ Zellen mit regulatorischen Eigenschaften beobachtet als bei stabilen Patienten unter anderen therapeutischen Kombinationen, was darauf hinweist, dass dieses Regime insbesondere die regulatorischen T-Zellen fördert. Tatsächlich hat die statistische Analyse des längerfristigen Verlaufs der Transplantatsituation von den Patienten aus dieser Studie gezeigt, dass unter Tacrolimus, MMF und Prednisolon der geringste Anteil an chronischen Abstoßungsreaktionen vorkam. Diese Tatsache könnte enorme Bedeutung für die Klinik haben, denn unsere Arbeit beweist erstmals auf zellulärer Ebene, dass gerade diese immunsuppressive Kombination die Toleranzmechanismen am stärksten fördert und somit am besten zum langzeitigen Transplantatüberleben beiträgt, wodurch sie in näherer Zukunft das Therapieregime der Wahl werden kann.

8. Literaturverzeichnis

1. Guild WR, Harrison JH, Merrill JP, Murray J: Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1955; 67:167-73
2. Kahan BD: Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989; 321(25):1725-38
3. Dong VM, Womer KL, Sayegh MH: Transplantation tolerance: the concept and its applicability. *Pediatr Transplant* 1999; 3(3):181-92
4. Yu LX, Shan HT, Fu SJ, Du CF, Ma JJ, Xu J, Deng WF, Wang YB: [Clinical study of tacrolimus in postoperative treatment of patients with renal transplantation for diabetic end-stage renal disease]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003; 23(11):1146-8
5. Youhua Z, Zhinlian M, Liming W: Clinical study of FK 506 in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2000; 32(7):1704
6. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66(4):807-15
7. Kunz J, Hall MN: Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem Sci* 1993; 18(9):334-8
8. Vella JP, Sayegh MH: Interactions between cyclosporine and newer antidepressant medications. *Am J Kidney Dis* 1998; 31(2):320-3
9. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA: FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992; 357(6380):692-4
10. Clipstone NA, Crabtree GR: Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357(6380):695-7
11. Bierer BE, Hollander G, Fruman D, Burakoff SJ: Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr Opin Immunol* 1993; 5(5):763-73
12. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A: The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1498(1):1-18
13. Van Rijen MM, Metselaar HJ, Hommes M, Ijzermans JN, Tilanus HW, Kwekkeboom J: Mycophenolic acid is a potent inhibitor of the expression of tumour necrosis factor- and tumour necrosis factor-receptor superfamily costimulatory molecules. *Immunology* 2003; 109(1):109-16
14. Denton MD, Magee CC, Sayegh MH: Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 1999; 353(9158):1083-91
15. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S, Cho YW, Yuge J: Risk rate and long-term kidney transplant survival. *Clin Transpl* 1996:443-58
16. Gjertson DW: A multi-factor analysis of kidney graft outcomes at one and five years posttransplantation: 1996 UNOS Update. *Clin Transpl* 1996:343-60
17. Thorogood J, Houwelingen JC, Persijn GG, Zantvoort FA, Schreuder GM, van Rood JJ: Prognostic indices to predict survival of first and second renal allografts. *Transplantation* 1991; 52(5):831-6
18. Pirsch JD, D'Alessandro AM, Sollinger HW, Hoffmann RM, Roecker E, Voss BJ, Lorentzen D, Knechtle SJ, Reed A, Kalayoglu M, et al.: The effect of donor age, recipient age, and HLA match on immunologic graft survival in cadaver renal transplant recipients. *Transplantation* 1992; 53(1):55-9
19. Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB: Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation* 1994; 57(9):1295-302

20. Shoskes DA, Wood KJ: Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 1994; 15(1):32-8
21. Benichou G, Tam RC, Soares LR, Fedoseyeva EV: Indirect T-cell allorecognition: perspectives for peptide-based therapy in transplantation. *Immunol Today* 1997; 18(2):67-71
22. Forbes RD, Zheng SX, Gomersall M, al-Saffar M, Guttman RD: Evidence that recipient CD8+ T cell depletion does not alter development of chronic vascular rejection in a rat heart allograft model. *Transplantation* 1994; 57(8):1238-46
23. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* 2005; 175(1):5-14
24. Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB: Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(5):757-64
25. Watschinger B: How T cells recognize alloantigen: evidence for two pathways of allorecognition. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10(9):1556-8
26. Dallman M: Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:632-8
27. Forsthuber T, Yip H, Lehman P: Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. *Science* 1996; 271:1728-30
28. He X, Chen D, Verma N, Plain K: Treatment with interleukin-4 prolongs allogeneic neonatal heart survival by inducing T-helper 2 responses. *Transplantation* 1998; 65:1145-52
29. Shirwan H, Barwari L, Khan NS: Predominant expression of T helper 2 cytokines and altered expression of T helper 1 cytokines in long-term allograft survival induced by intrathymic immune modulation with donor class I major histocompatibility complex peptides. *Transplantation* 1998; 66(12):1802-9
30. Fortin MC, Raymond MA, Madore F, Fugere JA, Paquet M, St-Louis G, Hebert MJ: Increased risk of thrombotic microangiopathy in patients receiving a cyclosporin-sirolimus combination. *Am J Transplant* 2004; 4(6):946-52
31. Fellstrom B: Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 2004; 36(2 Suppl):220S-223S
32. Djamali A, Premasathian N, Pirsch JD: Outcomes in kidney transplantation. *Semin Nephrol* 2003; 23(3):306-16
33. Gentil MA, Cantarell Aixendri C, Gonzalez Roncero FM, Marco Franco JE, Lopez De Mendoza Martinez M: Impact of the new drugs in the cost of maintenance immunosuppression of renal transplantation. Is it justified? *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 Suppl 3:iii77-82
34. Gonzalez Molina M, Sola E, Cabello M, Garcia C, Luna E, Rodriguez Algarra G: Effect of the immunosuppressive treatment on long-term renal graft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 Suppl 3:iii52-6
35. Lucan M, Iacob G, Lucan C, Lapusan C, Munteanu A, Sirbu S: Ten years of cyclosporine use in renal transplantation: a single-center experience with 479 renal transplants. *Transplant Proc* 2004; 36(2 Suppl):177S-180S
36. Keven K, Sahin M, Kutlay S, Sengul S, Erturk S, Ersoz S, Erbay B: Immunoglobulin deficiency in kidney allograft recipients: comparative effects of mycophenolate mofetil and azathioprine. *Transpl Infect Dis* 2003; 5(4):181-6
37. Martins L, Ventura A, Branco A, Carvalho MJ, Henriques AC, Dias L, Sarmiento AM, Amil M: Cyclosporine versus tacrolimus in kidney transplantation: are there differences in nephrotoxicity? *Transplant Proc* 2004; 36(4):877-9

38. Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G, Roodnat JJ, Christiaans MH, Vos PF, Moons P, Borm G, Hilbrands LB: Conversion from cyclosporine to tacrolimus improves quality-of-life indices, renal graft function and cardiovascular risk profile. *Am J Transplant* 2004; 4(6):937-45
39. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Vanrenterghem Y: Clinical efficacy and toxicity profile of tacrolimus and mycophenolic acid in relation to combined long-term pharmacokinetics in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(5):434-47
40. Moreno JM, Rubio E, Gomez A, Lopez-Monclus J, Herreros A, Revilla J, Navarrete E, Sanchez Turrion V, Jimenez M, Cuervas-Mons V: Effectiveness and safety of mycophenolate mofetil as monotherapy in liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35(5):1874-6
41. Lipshutz GS, Mahanty H, Feng S, Hirose R, Stock PG, Kang SM, Freise CE: Polyomavirus-associated nephropathy in simultaneous kidney-pancreas transplant recipients: a single-center experience. *Transplant Proc* 2004; 36(4):1097-8
42. Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammerhirt E, Oliveira J, Santos A, Bittar A, Keitel E, Garcia V, Neumann J, Saitovitch D: Cytomegalovirus disease latent and active infection rates during the first trimester after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36(4):896-8
43. Ravindra KV, Freifeld AG, Kalil AC, Mercer DF, Grant WJ, Botha JF, Wrenshall LE, Stevens RB: West Nile virus-associated encephalitis in recipients of renal and pancreas transplants: case series and literature review. *Clin Infect Dis* 2004; 38(9):1257-60
44. Lee YA, Kim HJ, Lee TW, Kim MJ, Lee MH, Lee JH, Ihm CG: First report of *Cryptococcus albidus*--induced disseminated cryptococcosis in a renal transplant recipient. *Korean J Intern Med* 2004; 19(1):53-7
45. Ryu HJ, Hahn JS, Kim YS, Park K, Yang WI, Lee JD: Complete resolution of post-transplant lymphoproliferative disorder (diffuse large B-cell lymphoma) with reduction of immunosuppressive therapy. *Yonsei Med J* 2004; 45(3):527-32
46. Karakus S, Ozyilkan O, Akcali Z, Demirhan B, Haberal M: Acute myeloid leukemia 4 years after Kaposi's sarcoma in a renal transplant recipient. *Onkologie* 2004; 27(2):163-5
47. Veroux M, Puliatti C, Fiamingo P, Cappello D, Macarone M, Puliatti D, Vizcarra D, Gagliano M, Veroux P: Early de novo malignancies after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36(3):718-20
48. Ciancio G, Burke G, Gaynor JJ: A Randomized Trial of Three Renal Transplant Induction Antibodies: Early Comparison of Tacrolimus, Mycophenolate Mofetil, and Steroid Dosing, and Newer Immune-Monitoring. *Transplantation* 2005; 80(Number 4):457-465
49. Muirhead N, House A, Hollomby DJ, Jevnikar AM: A comparison between cyclosporine and tacrolimus-based immunosuppression for renal allografts: renal function and blood pressure after 5 years. *Transplant Proc* 2003; 35(7):2391-4
50. Kist-van Holthe JE, Gasser M, Womer K, Najafian N, Dong V, Samsonov DV, Geehan CS, Chandraker A, Sayegh MH, Waaga AM: Regulatory functions of alloreactive Th2 clones in human renal transplant recipients. *Kidney Int* 2002; 62(2):627-31
51. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P: Allergen-responsive CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Children who Have Outgrown Cow's Milk Allergy. *J Exp Med* 2004; 199(12):1679-88

52. Snow JW, Abraham N, Ma MC, Herndier BG, Pastuszak AW, Goldsmith MA: Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice. *J Immunol* 2003; 171(10):5042-50
53. Lee MKt, Moore DJ, Jarrett BP, Lian MM, Deng S, Huang X, Markmann JW, Chiaccio M, Barker CF, Caton AJ, Markmann JF: Promotion of allograft survival by CD4+CD25+ regulatory T cells: evidence for in vivo inhibition of effector cell proliferation. *J Immunol* 2004; 172(11):6539-44
54. Hayashi Y, Tsukumo S, Shiota H, Kishihara K, Yasutomo K: Antigen-specific T cell repertoire modification of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172(9):5240-8
55. Chan C, Lechler RI, George AJ: Tolerance mechanisms and recent progress. *Transplant Proc* 2004; 36(2 Suppl):561S-569S
56. Gonwa T, Johnson C, Ahsan N, Alfrey EJ, Halloran P, Stegall M, Hardy M, Metzger R, Shield C, 3rd, Rocher L, Scandling J, Sorensen J, Mulloy L, Light J, Corwin C, Danovitch G, Wachs M, VanVeldhuisen P, Leonhardt M, Fitzsimmons WE: Randomized trial of tacrolimus + mycophenolate mofetil or azathioprine versus cyclosporine + mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation: results at three years. *Transplantation* 2003; 75(12):2048-53
57. Dharnidharka VR, Ho PL, Stablein DM, Harmon WE, Tejani AH: Mycophenolate, tacrolimus and post-transplant lymphoproliferative disorder: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Transplant* 2002; 6(5):396-9
58. Vincenti F: A decade of progress in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 77(9 Suppl):S52-61
59. Nankivell BJ, Chapman JR, Bonovas G, Gruenewald SM: Oral cyclosporine but not tacrolimus reduces renal transplant blood flow. *Transplantation* 2004; 77(9):1457-9
60. Harber M, Sundstedt A, Wraith D: The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2000; 2000:1-20
61. Spriewald B, Billing S, Wood KJ: Cytokines as mediators in immunologic tolerance. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2001; 6(1):7-13
62. Gebauer BS, Hricik DE, Atallah A, Bryan K, Riley J, Tary-Lehmann M, Greenspan NS, DeJelo C, Boehm BO, Hering BJ, Heeger PS: Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool. *Am J Transplant* 2002; 2(9):857-66
63. Hricik DE, Rodriguez V, Riley J, Bryan K, Tary-Lehmann M, Greenspan N, DeJelo C, Schulak JA, Heeger PS: Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2003; 3(7):878-84
64. Dugre FJ, Gaudreau S, Belles-Isles M, Houde I, Roy R: Cytokine and cytotoxic molecule gene expression determined in peripheral blood mononuclear cells in the diagnosis of acute renal rejection. *Transplantation* 2000; 70(7):1074-80
65. Alberu J, Richaud-Patin Y, Vazquez-Lavista LG, de Leo C, Guzman-Rodriguez H, Mancilla E, Correa-Rotter R, Chew-Wong A, Llorente L: In vivo IL-10 and TGF-beta production by PBMC from long-term kidney transplant recipients with excellent graft function: a possible feedback mechanism participating in immunological stability. *Clin Transplant* 2004; 18(2):174-8
66. Tan L, Howell WM, Smith JL, Sadek SA: Sequential monitoring of peripheral T-lymphocyte cytokine gene expression in the early post renal allograft period. *Transplantation* 2001; 71(6):751-9

67. Spadafora-Ferreira M, Fonseca JA, Granja C, Malheiros DM, Kalil J, Coelho V: Predominant IL-10 production in indirect alloreactivity is not associated with rejection. *Clin Immunol* 2001; 101(3):315-27
68. Fitzgerald JT, Johnson JR, Perez RV: Pre-transplant elevations of interleukin-12 and interleukin-10 are associated with acute rejection after renal transplantation. *Clin Transplant* 2004; 18(4):434-9
69. Sadeghi M, Daniel V, Weimer R, Wiesel M, Hergesell O, Opelz G: Pre-transplant Th1 and post-transplant Th2 cytokine patterns are associated with early acute rejection in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2003; 17(2):151-7
70. Halloran PF, Afrouzian M, Ramassar V, Urmson J, Zhu LF, Helms LM, Solez K, Kneteman NM: Interferon-gamma acts directly on rejecting renal allografts to prevent graft necrosis. *Am J Pathol* 2001; 158(1):215-26
71. Yamada K, Hatakeyama E, Arita S, Sakamoto K, Kashiwabara H, Hamaguchi K: Prediction of chronic renal allograft dysfunction from evaluations of TGF β 1 and the renin-angiotensin system. *Clin Exp Nephrol* 2003; 7(3):238-42
72. Simon T, Opelz G, Weimer R, Wiesel M, Feustel A, Ott RC, Susal C: The effect of ATG on cytokine and cytotoxic T-lymphocyte gene expression in renal allograft recipients during the early post-transplant period. *Clin Transplant* 2003; 17(3):217-24
73. Viklicky O, Matl I, Voska L, Bohmova R, Jaresova M, Lacha J, Lodererova A, Striz I, Teplan V, Vitko S: TGF-beta1 expression and chronic allograft nephropathy in protocol kidney graft biopsy. *Physiol Res* 2003; 52(3):353-60
74. Balandina A, Lecart S, Dartevelle P, Saoudi A, Berrih-Aknin S: Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune Myasthenia Gravis. *Blood* 2004
75. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, Baker SR, Liu B, Levine BL, June CH, Blazar BR, Porter SB: Cord blood CD4+CD25+ derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 2004
76. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS: TGF-beta Induces Foxp3 + T-Regulatory Cells from CD4 + CD25 - Precursors. *Am J Transplant* 2004; 4(10):1614-27

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierenden Zelle
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	DifferenzierungscluPred
CL	Cell Line (Zelllinie)
CMV	Zytomegalie-Virus
CR	Chronische Transplantatabstoßung
cpm	counts per minute (Ereignisse pro Minute)
CsA	Cyclosporin A
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme Linked Immunospot Assay
Fa.	Firma
FACS	Fluorescent activated cell sorter (Fluoreszenzzellsorter)
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FK 506	Tacrolimus
Gy	Gray
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human Leukozyt Antigen (Haupthistkompatibilitätskomplex beim Menschen)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
MHC	Major Histokompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMF	Mycophenolat Mofetil
MNZ	Mononukleare Zellen
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-Cells

NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
PBMC	Periphere Mononukleare Zellen
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phykoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
Pred	Prednisolon-Äquivalent
RT	Reverse Transkriptase
SF	stabile Transplantatfunktion
Std	Stunden
TCR	T-cell-receptor (T-Zell-Rezeptor)
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
U	Units (Einheiten)
UNOS	United Network for Organ Sharing
u.a.	unter anderem
vs	versus

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. A. Thiede, dem Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg, danke ich dafür, dass er mir die Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit ermöglichte.

Für die Überlassung des Themas, die hilfreiche Anleitung zur selbstständigen wissenschaftlichen Tätigkeit und Ausarbeitung dieser Arbeit, tiefgreifende und verständnisvolle Unterstützung gilt mein herzlicher Dank der Fr. Prof. Dr. rer. nat. A. M. Waaga-Gasser.

Herrn Dr. med. M. Gasser danke ich vielmals für die herausragende Betreuung während meiner Tätigkeit und für die immer sehr konstruktiven und intensiven Diskussionen und Besprechungen meiner Ergebnisse, was eine unmittelbare Rolle für das Zustandekommen dieser Arbeit gespielt hat.

Herrn Prof. Dr. med. C. Wanner und Herrn Dr. med. K. Lopau, Mitarbeitern der Nephrologie, Innere Medizin, danke ich besonders für die freundliche und offene Hilfe bei der Zusammenstellung des Patientenkollektivs und der Probenbesorgung.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Molekular Onkoimmunologischen Labors, insbesondere Fr. A. Trumpfheller, die mich immer herzlich unterstützt haben.

Ausserdem danke ich allen Mitarbeitern der Transfusionsmedizin, insbesondere dem Herrn PD Dr. med. A. Opitz, für die freundliche Hilfe bei der Zellenbestrahlung.

Allen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die herrlichen Vorträge bei den Doktorandenseminaren danken.

Besonders gilt mein Dank meinen liebevollen Eltern, Grosseltern und meiner Frau, die in allen Situationen hinter mir standen.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Igor Tsaur
Geburtsdatum und -ort: 14.02.1979, Podolsk/Russland
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1986-1996 Mittelschule, Podolsk, Russland
1996-1999 Friedrich-König-Gymnasium, Würzburg
Juni 1999 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium/Universitäre Laufbahn:

Nov. 1999 – Mai 2006 Studium der Humanmedizin an der Julius Maximilians
Universität Würzburg
April 2005 – Februar 2006 Praktisches Jahr, Uni-Klinik Würzburg (Innere Medizin,
Chirurgie, Urologie)
April 2006 Drittes Staatsexamen
April 2006 Ärztliche Vollapprobation, Würzburg
Seit Mai 2006 Assistenzarzt, Chirurgie, Uni-Klinik Würzburg

Wissenschaftliche Erfahrung/Ausbildung

2002-2005 Doktorand an der Julius Maximilians Universität Würzburg,
Zentrum Operative Medizin, Chirurgische Klinik I,
Molekulare Onkoimmunologie (Prof. Dr. A.M. Waaga-
Gasser)
2007 (12.06.) Promotion an der Julius Maximilians Universität Würzburg
über das
*Thema: Untersuchungen zum immunologischen Monitoring
chronischer Abstoßung bei nierentransplantierten Patienten
unter unterschiedlichen immunsuppressiven Protokollen.*

Mitgliedschaften

2003 American Society of Transplantation (AST)

Auszeichnungen und Preise:

- 2003 Investigator Award, World Congress of Nephrology
(*Co-Preisträger*)
- 2003 Travel Award, AST Fellows Symposium on Transplantation
Medicine
- 2003 Deutsche Transplantationsgesellschaft (DTG), Münster
(*Co-Preisträger*)
- 2005 International Pediatric Transplantation Association (IPTA),
3rd World Congress

Eingeladene Vorträge:

- 02/2004 'Eigenschaften und Funktionen der Th2-Zellen'
Arbeitsgruppe: Molekulare Onkoimmunologie, Julius
Maximilians Universität Würzburg
- 04/2004 'Untersuchungen regulatorischer T-Zellen bei humanen
Nierentransplantatempfängern', Promomed Kongress 2004,
Julius Maximilians Universität Würzburg
- 05/2004 'Die Wertigkeit MMF-basierter Immunsuppression auf das
selektive Überleben CD4+/CD8+ Th2 spezifischer T Zellen
mit Regulator-/ Suppressoreigenschaften bei Patienten nach
Nierentransplantation', 11. Bremer Werkstattgespräch,
Bremen
- 11/2004 'Assessment of regulatory T-cell functions in kidney
transplant patients on MMF based immunosuppression'
Chirurgische Klinik I, Julius Maximilians Universität
Würzburg
- 05/2004 'Assessment of regulatory T cell functions in kidney
transplant patients on various immunosuppressive
treatment', Brigham and Women's Hospital, Harvard
Medical School, Boston, USA

Originalarbeiten

Tsaur I, Gasser M, Lopau K, Bueter M, Trumpfheller A, Dragan M, Opitz A, Kist-van
Holthe JE, Clarkson M, Mueller S, Thiede A, Meyer D, Waaga-Gasser AM.

Analyse der Funktionen regulatorischer T-Zellen bei Patienten nach Nieren-
transplantation unter MMF-basierter Immunsuppression.

Transplant Med 2004;16:106-108.

Tsaur I, Aviles B, Lopau K, Grimm M, Nichiporuk E, Thiede A, Meyer D, Waaga-
Gasser AM, Gasser M. Immunological monitoring for chronic rejection in kidney
transplanted patients.

Langenbecks Arch Chir 2006 (im Druck)

Tsaur I, Gasser M, Lopau K, Meyer D, Gassel H-J, Trumpfheller A, Opitz A, Clarkson M, Kist-van Holthe JE, Bueter M, Mueller S, Dragan M, Thiede A, Waaga-Gasser AM. Assessment of Regulatory T Cell Functions in Kidney Transplant Patients on Mycophenolate Mofetil and Tacrolimus Based Immunosuppression. *J Am Soc Nephrol (JASN) 2006 (eingereicht)*

Publikationen nach Präsentationen / zitierfähige Abstracts

Gasser M, **Tsaur I**, Büter M, Trumpfheller A, Meyer D, Waaga-Gasser AM. Untersuchung CD4+/CD8+ Th1- und Th2-spezifischer Zelllinien aus Patienten nach Nierentransplantation in Abhängigkeit der Immunsuppression unter Verwendung von MMF. *Transplant Med 2003;93*.

Gasser M, Kist-van Holthe JE, **Tsaur I**, Bueter M, Trumpfheller A, Meyer D, Waaga-Gasser AM. CD4+/CD8+ T cell analyses of regulatory/suppressor T cell function from kidney transplant patients on MMF based immunosuppressive protocol. *J Am Soc Nephrol 2003; 14:421A*.

Tsaur I, Gasser M, Trumpfheller A, Lopau K, Clarkson M, Kist-van Holthe JE, Opitz A, Bueter M, Waaga-Gasser AM. Assessment of regulatory T cell functions in kidney transplant patients on MMF based immunosuppression. *Am J Transplant (AJT) 2004; 4(8):429*.

Tsaur I, Gasser M, Trumpfheller A, Lopau K, Opitz A, Clarkson M, Kist-van Holthe JE, Bueter M, Thiede A, Waaga-Gasser AM. Assessment of regulatory T cell functions in kidney transplant patients on mycophenolat mofetil based immunosuppression. *Transplantation 2004;78(2):461*.

Tsaur I, Gasser M, Lopau K, Trumpfheller A, Clarkson MR, Meyer D, Opitz A, Thiede A, Waaga-Gasser AM. Analysis of regulatory T cell functions in kidney transplant patients on MMF based immunosuppression. *Clinical and Investigative Medicine 2004;27(4):148D*.

Tsaur I, Gasser M, Lopau K, Trumpfheller A, Clarkson M, Kist-van Holthe JE, Opitz A, Thiede A, Chandraker A, Waaga-Gasser AM. Analysis of regulatory T cells in kidney transplant patients on MMF based immunosuppression. *Journal of the American Society of Nephrology (JASN) 2004;15:518A*.

Orale Präsentationen

Tsaur I, Gasser M, Waaga-Gasser AM.

Analyse der Funktionen regulatorischer T-Zellen bei Patienten nach Nierentransplantation unter MMF-basierter Immunsuppression.

5. Promomed-Kongress, Wuerzburg, 16.01. – 17.01.2004.

Tsaur I, Gasser M, Lopau K, Opitz A, Trumpfheller A, Meyer D, Wanner C, Thiede A, Waaga-Gasser AM.

Die Wertigkeit MMF-basierter Immunsuppression auf das selective Überleben CD4+/CD8+ Th2 spezifischer T Zellen mit Regulator-/Suppressoreigenschaften bei Patienten nach Nierentransplantation.

11. Bremer Werkstattgespräch zur Organtransplantation „Thomas Grote“, Bremen, 07.05. – 08.05.2004.

Tsaur I, Gasser M, Trumpfheller A, Lopau K, Clarkson M, Kist-van Holthe J, Opitz A, Bueter M, Waaga-Gasser AM.

Assessment of regulatory T cell functions in kidney transplant patients on MMF based immunosuppression.

American Transplant Congress 2004, Boston, MA, 14.05. – 19.05.2004.

Gasser M, Lenhard SM, Grimm MW, Grimm MR, **Tsaur I**, Mueller S, Trumpfheller A, Hancock WW, Chandraker A, Meyer D, Thiede A, Sayegh MH, Waaga-Gasser AM.

Th2 cell transfer induces specific tolerance and is associated with regulation of the immune response in experimental kidney transplantation.

7th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery, Debrecen, Hungary, 01. – 04.09.2004.

Tsaur I, Gasser M, Avilez B, Lopau K, Trumpfheller A, Kist van-Holthe J, Waaga-Gasser A.M.

Immunological monitoring for kidney transplanted patients on various immunosuppressive protocols.

International Pediatric Transplantation Association (IPTA), 3rd World Congress, Innsbruck, Austria, 06. – 09.08.2005. – Preis

Tsaur I, Aviles B, Lopau K, Grimm M, Nichiporuk E, Thiede A, Meyer D, Waaga-Gasser AM, Gasser M. Immunological monitoring for chronic rejection in kidney transplanted patients.

123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 02. – 05.05. 2006, Berlin

Poster Präsentationen

Gasser M, **Tsaur I**, Büter M, Trumpfheller A, Meyer D, Waaga-Gasser AM.
Untersuchung CD4+/CD8+ Th1 und Th2 spezifischer Zell-Linien aus Patienten nach Nierentransplantation in Abhängigkeit der Immunsuppression unter Verwendung von MMF.

12. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Münster, 02.10.-04.10.2003 – Preis

Gasser M, Kist-van Holthe JE, **Tsaur I**, Bueter M, Trumpfheller A, Meyer D, Waaga-Gasser AM.

CD4+/CD8+ T cell lines analyses of regulatory/suppressor T cell function from kidney transplant patients on MMF based immunosuppressive protocol.

36th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, San Diego, CA, 12.11.-17.11.2003 - Preis

Tsaur I, Gasser M, Lopau K, Trumpfheller A, Clarkson MR, Meyer D, Opitz A, Thiede A, Waaga-Gasser AM.

Analysis of regulatory T cell functions in kidney transplant patients on MMF based immunosuppression.

12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal, Quebec, 18.07. – 23.07.2004.

Tsaur I, Gasser M, Trumpfheller A, Lopau K, Opitz A, Kist-van Holthe JE, Clarkson M, Bueter M, Thiede A, Waaga-Gasser AM.

Assessment of regulatory T cell functions in kidney transplant patients on Mycophenolat Mofetil based immunosuppression.

XX International Congress of The Transplantation Society, Vienna, Austria, 05. – 10.09.2004.

Tsaur I, Gasser M, Lopau K, Trumpfheller A, Clarkson M, Kist-van Holthe JE, Opitz A, Thiede A, Chandraker A, Waaga-Gasser AM.

Analysis of regulatory T cells in kidney transplant patients on MMF based immunosuppression.

American Society of Nephrology (ASN), 37th Annual Meeting , St. Louis, Missouri, 29.10 – 01.11.2004.

Würzburg, 20.04.2006

Igor Tsaur