

Abstakt

Hintergrund: Um akute Rejektionen nach Nierentransplantation früh erkennen und behandeln zu können, gleichzeitig die Nebenwirkungen einer immunsuppressiven Therapie zu minimieren, wäre die Etablierung eines “Immunmonitorings”, welches zu jedem Zeitpunkt Hinweise auf die Aktivierung des Immunsystems des Empfängers gegen das Transplantat gibt, wünschenswert.

Methodik: In dieser Studie wurden die Anzahl der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden T-Zellen von 52 nierentransplantierten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten vor (prä-TX) und nach Transplantation (post-TX) im ELISpot-Assay gemessen und in Zusammenhang mit der klinischen Entwicklung gebracht. Außerdem wurde das Assay auf Reproduzierbarkeit untersucht und versucht zu optimieren.

Ergebnisse: Eine stark erhöhte Anzahl spenderreaktiver Zellen prä-TX (>200 IFN γ -spots/ $3 \cdot 10^5$ PBMZ, $n = 5$) war immer mit einer akuten Rejektion des Transplantats assoziiert. Post-TX korrelierte die Anzahl der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen mit der Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation. Diese Korrelation wurde in den Wochen 2 und 3 post-TX und bei Patienten ohne akute Rejektion, besonders deutlich. Hinsichtlich der methodischen Optimierung hat sich die magnetische Depletion CD2^{pos}-Zellen als effektiv gezeigt, die IFN γ -Sekretion von Stimulatorzellen zu unterbinden. Um die Reproduzierbarkeit des Assays zu verbessern sollten Stimulatorzellen im Überschuss und Empfänger-T-Zellen in einer konstanten Anzahl eingesetzt werden. Dabei sollte die Gesamtzellzahl über 10^6 Zellen/ml betragen.

Conclusion: Das ELISpot-Assay ist zur Erkennung klinisch relevanter T-Zellsensibilisierungen vor und nach Transplantation geeignet. Vor einem Einsatz in der klinischen Routine sollten jedoch einige methodische Verbesserungen vorgenommen werden.

Schlagwörter:

Nierentransplantation,

spenderspezifische T-Zellen,

ELISpot-Assay,

Interferon gamma

Abstract

Background: In order to perform early diagnosis and treatment of acute rejections after renal transplantation while minimizing side effects of immunosuppression, an immune monitoring tool is needed, which gives information on the activation state of the immune system of the transplant recipient against the allograft at any given time.

Methods: In this study, frequencies of donor-reactive, IFN γ -producing T cells were measured in 52 renal transplant recipients at different time points before (pre-TX) and after transplantation (post-TX) using the ELISPOT-assay. The frequencies were correlated with clinical outcome. Also, the reproducibility of the assay and possibilities of optimization were tested.

Results: Highly elevated frequencies of donor-reactive cells pre-TX (>200 IFN γ -spots/ 3×10^5 PBMC's, $n = 5$) were always associated with acute rejection episodes after transplantation. Post-TX frequencies of donor-reactive, IFN γ -producing cells correlated significantly with graft function one year post-TX. This correlation was strongest for frequencies in week 2 and 3 post-TX and in patients without acute rejection. Regarding the methodical optimization, magnetic CD2^{pos}-cell depletion of donor leucocytes proved useful to inhibit IFN γ secretion of stimulating cells. To improve reproducibility of the assay stimulating cells should be used as a surplus, a constant number of responding T cells should be chosen, and overall cell concentration should exceed 10^6 cells/ml.

Conclusion: The ELISPOT-assay is a useful tool to detect clinically relevant T cell sensitisation pre- and post-TX. Before it is routinely used some methodical alterations must be performed.

keywords:

renal transplantation,

donor-specific T cells,

elispot-assay,

interferon gamma

Inhaltsverzeichnis

Abstakt	3
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
Zusammenfassung	10
1 Einleitung	12
2 Theoretischer Hintergrund	15
2.1 Die akute Rejektion	15
Diagnose	15
Risikofaktoren	16
Therapie	16
Komplikationen	16
2.2 Die CTN- die chronische Transplantat-Nephropathie	17
Diagnose	17
Pathogenese	17
2.3 Der Tod des Patienten bei funktionsfähigem Transplantat	19
Kardiovaskuläre Erkrankungen	19
Tumore	20
Infektionen	20
2.4 Die Immunantwort	21
Bedeutung von T-Zellen	21
T-Zellaktivierung	22
Immunität gegen das Transplantat	23
Bedeutung von IFN γ	25
Gedächtniszellen und Effektorzellen	25

2.5 Das ELISpot-Assay - Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay	26
3 Aufgabenstellung	28
4 Methoden	30
Studiendesign	30
Zellpräparation	31
Zellzahlbestimmung	32
Kryokonservierung von Spenderzellen	33
ELISpot-Assay	34
CD2 ^{pos} Zelldepletion durch MACS - Magnetic Cell Sorting	38
Messung des Anteils der T-Zellen in PBMZ	39
Erfassung transplantationspezifischer Daten	40
Statistische Analysen	41
5 Materialien	42
Patienten und Probanden	42
Verbrauchsmaterialien und wiederverwendbare Materialien	44
Geräte	45
Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien	46
Zellstimulantien und Antikörperkonjugate	49
Verwendete Software	49
6 Ergebnisse	50
6.1 Einige Patientenbeispiele im Verlauf	52
Patienten ohne Nachweis spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen	52
Patienten mit spenderreaktiven Zellen prä-Tx	52
Patienten mit spenderreaktiven Zellen post-Tx	55
Patienten, die eine OKT3-Induktionstherapie erhielten	56
6.2 Spenderreaktive, IFNγ-produzierende Zellen prä-Tx	60
Zusammenhang mit frühen akuten Rejektionen	60
Zusammenhang mit der Nierenfunktion	61
Zusammenhang mit Sensibilisierungsfaktoren	61
Zusammenhang zwischen spenderreaktiven Zellen prä- und post-Tx	62
6.3 Spenderreaktive, IFNγ-produzierende Zellen post-Tx	63
Zusammenhang mit der Nierenfunktion	63
Zusammenhang mit frühen akuten Rejektionen	66
Zusammenhang mit Sensibilisierungsfaktoren	68

Inhaltsverzeichnis	7
6.4 Besonderheiten immunsuppressiver Therapieschemata	70
Patienten, die mit FTY720 behandelt wurden	70
Patienten, die eine OKT3-Induktionstherapie erhielten	71
Patienten, die eine Lebendspende erhielten	72
6.5 Versuch der Optimierung des ELISpot-Assays	73
Reproduzierbarkeit	73
Ciclosporin A	74
Tacrolimus	75
CD2 ^{pos} -Zelldepletion	76
Bestrahlung	77
Anteil der T-Zellen an Responder-PBMZ	78
Optimale Zellkonzentrationen	79
7 Diskussion	82
7.1 Bewertung der angewandten Methodik	82
Bestimmung spenderreaktiver Zellen in PBMZ	82
Stellenwert des ELISpot-Assays	83
Versuch der Optimierung des Assays	84
Einschränkung der Interpretation der Werte	87
7.2 Immunologische Interpretation	88
Allgemeine Interpretation der gemessenen Zellen	88
Subklinische Rejektion	90
Direkte versus indirekte Präsentation	91
T1/T2-Polarisation	93
CD4 ^{pos} -/CD8 ^{pos} T-Zellen	95
Regulatorisches IFN γ ?	96
7.3 Klinische Relevanz der Ergebnisse	98
Bestimmung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen prä-Tx	98
Bestimmung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen post-Tx	100
8 Literaturverzeichnis	104
9 Anhang	116
Danksagung	116
Eidesstattliche Erklärung	117
Lebenslauf	118

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Studiendesign	31
Abb. 2 Schema zum Mechanismus des ELISpot-Assays	34
Abb. 3 Kamerablick auf IFN γ -Spots spenderreaktiver Zellen im ELISpot-Assay	35
Abb. 4 Patienten ohne spenderreaktive, IFN γ -produzierender Zellen prä- und post-Tx	53
Abb. 5 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen prä-Tx	54
Abb. 6 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen prä-Tx (2)	55
Abb. 7 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen post-Tx	57
Abb. 8 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen post-Tx (2)	58
Abb. 9 Patienten mit OKT3-Induktionsschema	59
Abb. 10 Spenderreaktive Zellen prä-Tx bei Patienten mit und ohne frühe aRx	60
Abb. 11 Spenderreaktive Zellen prä-Tx bei Patienten mit und ohne PRA prä-Tx	62
Abb. 12 Nierenfunktion ein Jahr post-Tx	65
Abb. 13 Nierenfunktion ein Jahr post-Tx bei Patienten ohne aRx	67
Abb. 14 Spenderreaktive Zellen post-Tx und Nierenfunktion bei Patienten mit und ohne aRx	68
Abb. 15 Hämodialysedauer und spenderreaktive Zellen post-Tx	69
Abb. 16 HLA-Gesamt-Mismatch und spenderreaktive Zellen in Woche 2 post-Tx	70
Abb. 17 Max. spenderreaktive Zellen post-Tx bei Patienten mit Lebend- und Kadaverspenden	73
Abb. 18 IFN γ -Sekretion CMV-spezifischer T-Zellen nach Einwirkung von Ciclosporin A	74
Abb. 19 IFN γ -Sekretion CMV-spezifischer T-Zellen nach Einwirkung von Tacrolimus	75
Abb. 20 Übertragung von Tacrolimus auf unbehandelte CMV-spezifische T-Zellen	75
Abb. 21 IFN γ -Sekretion von CD2-depletierten Leukozyten unter PHA-Stimulation	76
Abb. 22 Aktivierung alloreaktiver T-Zellen durch CD2-depletierte allogene Leukozyten	77
Abb. 23 IFN γ -Sekretion (nach allogenem Stimulus) und Allogenität bestrahlter Leukozyten	78
Abb. 24 Anteil von T-Zellen an PBMZ zu verschiedenen Zeitpunkten prä- und post-Tx	79
Abb. 25 IFN γ -Spots im Zusammenhang mit der Anzahl der Stimulator- und der Responderzellen	80
Abb. 26 Die alloreaktive T-Zell-Antwort konvergiert bei einer sättigenden Stimulation	80
Tab. 1 Charakteristika der untersuchten Patienten	43
Tab. 2 Extremwerte und Mediane aller Messwerte	50
Tab. 3 Sensibilisierung und Transplantationsverlauf der Patienten mit > 200 IFN γ -Spots prä-Tx	61
Tab. 4 Korrelation: spenderreaktive Zellen post-Tx und Nierenfunktion	64
Tab. 5 Korrelation: spenderreaktive Zellen post-Tx und Nierenfunktion bei Patienten ohne aRx	66
Tab. 6 Sensibilisierung und Transplantationsverlauf der Patienten mit FTY720	71
Tab. 7 Sensibilisierung und Transplantationsverlauf der Patienten mit OKT3-Induktion	72
Tab. 8 Sensibilisierung und Transplantationsverlauf der Patienten mit einer Lebensspende	73

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin	M	Monat
aRx	akute Rejektion	MP	Methylprednisolon
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin	mRNA	messenger ribonucleid acid
CD	cluster of differentiation	n	Anzahl, nein
CMV	Cytomegalie-Virus	neg.	seronegativ (z.B. CMV)
Con A	Concavalin A	NK-	natürliche Killerzellen
CTN	chronische Transplantat-Nephropathie	o.A.	ohne Angaben
D+/-	Spender ist positiv/ negativ	p	Wahrscheinlichkeit, dass der statistische Zusammenhang zufällig ist
DMSO	Dimethylsulfoxid	P1	Proband 1
EBV	Ebstein-Barr-Virus	PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
ELISpot	enzyme-linked immunosorbent spot	PBMZ	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
et al.	et alumni = und Mitarbeiter	PBS	phosphate buffered saline
FKS	fetales Kälberserum	PCR	polymerase chain reaction
GFR	glomeruläre Filtrationsrate	SSP/SSO	sequent specific primers / oligonucleotide probes
HLA	human leukocyte antigen = humanes MHC-Molekül	PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
HZV	Herpes-Zoster-Virus	PHA	Phytohemagglutinin
IFN γ	Interferon gamma	pos.	positiv
j	ja	post-Tx	nach der Transplantation
J	Jahr	pp65	Phosphoprotein 65 HCMV
IL2	Interleukin 2	PRA	panelreaktive Antikörper in %
KHK	koronare Herzkrankheit	prä-Tx	vor der Transplantation
LDA	limiting dilution assay	R+/-	Empfänger ist positiv/ negativ
mM	Millimol	r _s	Spearman'scher Korrelationskoeffizient
mAk	monoklonaler Antikörper	SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
MACS	magnetic activated cell sorting	T	Tag
MDRD	modification of diet in renal disease	TNF α	Tumornekrosefaktor α
MHC	major histocompatibility complex	TGF β	transforming growth faktor β
mittl.	mittlerer	Tx	Transplantation
MLR	mixed lymphocyte reaction	W	Woche
MMF	Mycophenolat Mofetil	VZV	Varizella-Zoster-Virus

Zusammenfassung

Für den Erfolg einer Nierentransplantation ist es wichtig, Risikofaktoren für eine immunologische Schädigung des Organs vor der Transplantation zu minimieren und akute Rejektionen nach Transplantation früh zu diagnostizieren und zu therapieren um einen Transplantatverlust oder die Entwicklung einer chronischen Transplantat-Nephropathie (CTN) zu verhindern. Ebenso erstrebenswert ist eine individuelle Therapieanpassung, welche die Nebenwirkungen der medikamentösen Immunsuppression auf ein Minimum reduziert. Die Etablierung eines „Immunmonitorings“, welches zu jedem Zeitpunkt Hinweise auf die momentane Aktivierung des Immunsystems des Empfängers gegen das Transplantat gibt, und zwar sowohl vor wie nach der Transplantation, bedeutet eine Annäherung an diese Ziele.

Da T-Zellen eine zentrale Rolle bei der akuten Transplantatrejektion spielen und $\text{IFN}\gamma$, welches von aktivierten T-Zellen sezerniert wird, ebenfalls in Zusammenhang mit akuten und chronischen Rejektionen gebracht wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Anzahl spenderreaktiver, $\text{IFN}\gamma$ -produzierender Zellen aus dem peripheren Blut nierentransplantierte Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und mit den klinischen Verläufen verglichen. Dazu wurden 52 Patienten direkt vor Transplantation sowie wöchentlich innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation 20 ml Zitratblut abgenommen und die daraus präparierten mononukleären Zellen (PBMZ) mit Spenderleukozyten für 24 h im Verhältnis 1:1 im ELISpot-Assay stimuliert. Das ELISpot-Assay ist eine von Heeger et al. für diese Fragestellung adaptierte Technik, in der $\text{IFN}\gamma$ direkt neben der sezernierenden T-Zelle durch Antikörper an eine Membran gebunden und über eine enzymatische Reaktion als farbiger „Spot“ sichtbar wird [1]. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung wurde das Assay auf Reproduzierbarkeit überprüft und versucht zu optimieren. Dabei standen die eingesetzte Zellkonzentration und die Inhibition der $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion durch Spenderzellen im Vordergrund, wobei der Einfluss von Bestrahlung, Calcineurininhibitoren und T-Zell-Depletion untersucht wurde.

Es ergab sich für die Werte vor Transplantation ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit früher akuter Rejektion und Patienten ohne Rejektion. Stark erhöhte Frequenzen ($>200 \text{ IFN}\gamma\text{-Spots}/3 \cdot 10^5 \text{ Empfänger-PBMZ}$, $n = 5$) waren immer mit einer akuten Rejektion assoziiert. Bei Messwerten unter 200 Spots vor Transplantation wurde jedoch keine klare Assoziation zu frühen akuten Rejektionen beobachtet. Nach Transplantation konnte kein

statistischer Unterschied der Messwerte zwischen Patienten mit früher akuter Rejektion und Patienten ohne Rejektion ihres Organs gezeigt werden. Dahingegen korrelierte die Anzahl der nach Transplantation gemessenen IFN γ -produzierenden Zellen mit der Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation, welche ihrerseits einen prognostischen Marker für die Langzeitfunktion des Transplantats darstellt [2]. Diese Korrelation wurde für die Messwerte in Woche 2 und 3 sowie innerhalb der Gruppe der Patienten ohne akute Rejektion besonders deutlich. Daher handelt es sich bei einem erhöhten Wert innerhalb dieses Zeitraums um einen vom Auftreten akuter Rejektionen unabhängigen Risikofaktor für eine schlechtere Langzeitprognose des Spenderorgans. Die Anzahl spenderreaktiver Zellen nach Transplantation korrelierte außerdem mit dem HLA-Mismatch und war für Empfänger von Kadaverspenden sowie Patienten mit langer Hämodialysedauer (min. 79 Monate) signifikant höher als für Empfänger einer Lebendspende bzw. Patienten mit kurzer Hämodialysedauer. Hinsichtlich der methodischen Optimierung des Assays erwies sich die magnetische CD2^{pos}-Zelldepletion der Spenderleukozyten, mit der T-Zellen und NK-Zellen aus den stimulierenden Zellen entfernt werden, als effektiv, die IFN γ -Sekretion der Spenderzellen zu unterbinden. Der Einsatz von stimulierenden Zellen im Überschuss, die Einstellung der Empfänger-PBMZ auf eine konstante Anzahl von T-Zellen sowie eine Zellkonzentration von über 10^6 /ml im Assay könnten in Zukunft ebenfalls die Reproduzierbarkeit und Reliabilität des Assays verbessern, dessen Variationskoeffizient bis über 0,4 betrug.

Mit Hilfe des ELISpot-Assays scheint es möglich, sowohl eine klinisch relevante T-Zell-Sensibilisierung vor einer Transplantation zu erkennen als auch Patienten mit einem Risiko für eine immunologisch vermittelte Funktionseinschränkung des Transplantats zu einem frühen Zeitpunkt nach der Transplantation zu identifizieren. Vor Einsatz in der klinischen Routine muss jedoch die Methodik noch weiter verbessert werden, um die klinische Relevanz zu sichern.

1 Einleitung

Bei etwa 170 Patienten von einer Million Einwohner Deutschlands wird jährlich eine chronische Niereninsuffizienz neu diagnostiziert [3]. Unter Niereninsuffizienz versteht man eine nicht ausreichende oder völlig ausgefallene Nierenfunktion. Es handelt sich dabei um einen meist langsam fortschreitenden Verlust von funktionsfähigem Nierengewebe, der in der Folge zu einer Abnahme des Glomerulumfiltrates führt und in der Regel als Folgeschaden verschiedener zugrunde liegender chronischer Krankheiten auftritt:

- Diabetische Nephropathie (ca. 36 %)
- Chronische Glomerulonephritis (ca. 14 %)
- Interstitielle Nephritis und chronische Pyelonephritis (ca. 9 %)
- Hypertone vaskuläre Nephropathie (ca. 18 %)
- Polyzystische Nephropathie (ca. 5 %)
- Systemerkrankungen wie z.B. Vaskulitiden oder Syst. Lupus Erythematoses (ca. 4 %)
- hereditäre/ kongenitale Niereninsuffizienz (ca. 1 %)
- Analgetikanephropathie und sonstige Ursachen (ca. 4 %)
- nicht klassifizierte Ursachen (ca. 9 %)

(Diagnoseverteilung bei Inzidenz und Aufnahme in eine Nierenersatztherapie 2002 [3])

Im fortgeschrittenen Stadium der Niereninsuffizienz kommt es zu einer Hypertonie und aufgrund der mangelnden Flüssigkeitsausscheidung zu Lungenödemen, Pleura- bzw. Perikardergüssen sowie zur Neigung zu peripheren Ödemen. Als Folge verminderter Hormonfreisetzung treten Knochenveränderungen und Blutbildveränderungen wie die sogenannte renale Anämie auf. Durch die Ansammlung von nicht ausgeschiedenen harnpflichtigen Substanzen im Blut werden Beschwerden im Magen-Darm-Trakt wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe sowie weitere typische Symptome wie Juckreiz, Wadenkrämpfe und der Geruch der Betroffenen nach Urin, der sogenannte Foetor uraemicus, hervorgerufen. Es kann auch zu neurologischen Symptomen wie Sensibilitätsstörungen, Konzentrationsschwäche, Verwirrtheit bis hin zur Bewusstlosigkeit und zum urämischen Koma kommen. Bei einem vollständigen Funktionsausfall der Nierenglomeruli spricht man von terminalem Nierenversagen, das ohne Maßnahmen innerhalb relativ kurzer Zeit zum Tod führt. Lebensrettend ist dann lediglich die Dialyse oder die Transplantation einer Spenderniere.

Bei dem in Deutschland überwiegend praktizierten Hämodialyseverfahren wird das Blut des Patienten drei-viermal wöchentlich für vier bis acht Stunden über einen Katheter von harnpflichtigen Substanzen gereinigt. Daneben gibt es noch die Möglichkeit der meist täglichen Peritonealdialyse, bei der die harnpflichtigen Substanzen über das als semipermeable Membran genutzte Peritoneum in eine in den Bauchraum geleitete Dialyselösung diffundieren. Neben dem enormen Zeitaufwand beklagen Dialysepatienten vor allem die körperliche Anstrengung und Einschränkung. Eine Nierentransplantation führt dagegen zu einer wesentlich besseren Lebensqualität.

Die erste Nierentransplantation am Menschen wurde im November 1911 in Philadelphia, USA durchgeführt. Allerdings nahm das Transplantat seine Funktion nicht auf. Neben technischen Problemen verhinderte vor allem das Unwissen über immunologische Zusammenhänge den Erfolg der Transplantation. Erst im Jahre 1947 gelang der Durchbruch, als einer Patientin mit akutem Nierenversagen eine Niere extrakorporal am Arm transplantiert wurde. Die Niere arbeitete einige Tage - die Patientin überlebte [4].

In Deutschland wurden seit 1963 fast 50000 Nierentransplantationen durchgeführt, 2346 davon allein im Jahr 2001. Dabei wurde durch kontinuierliche Verbesserung immunsuppressiver Medikamente, die das transplantierte Organ vor immunologischen Angriffen des Organempfängers schützen sollen, eine stetige Verlängerung des Transplantatüberlebens erreicht. Während in den 60er Jahren 80 % der Lebendspenden und nur 50 % der Kadaverspenden ein Jahr nach Transplantation noch ausreichende Funktion zeigten [4], lag die 1-Jahres-Transplantatüberlebensrate bei Patienten, die im Jahr 2002 in Deutschland transplantiert wurden für Lebendspenden bei 94 % und für Kadaverspenden bei 82 % [5]. Dies wurde einerseits durch besseres perioperatives Management, andererseits vor allem durch die Einführung von Ciclosporin A in den 80er Jahren erreicht, aber auch durch weitere Substanzen wie Antilymphozyten-Antikörper (OKT3, ATG), Tacrolimus, IL2-Rezeptorantagonisten, Mycophenolat Mofetil, oder Sirolimus, die Eingang in die immunsuppressive Therapie fanden. Heutzutage werden mehrere Substanzen miteinander kombiniert, um den immunsuppressiven Effekt optimal und die Nebenwirkungen der einzelnen Substanzen minimal zu gestalten, wobei meist eine Kombination aus Kortikosteroiden mit einem Calcineurininhibitor (Ciclosporin A oder Tacrolimus) in Verbindung mit einer oder mehreren weiteren Substanzen bevorzugt wird. Andere Kombinationen oder neue immunsuppressive Medikamente wie FTY720 [6] oder Campath 1H [7] werden derzeit in Studien getestet.

Trotz der Erfolge, die in den letzten Jahren vor allem kurzfristig zu verzeichnen sind, sind die Langzeitergebnisse der Nierentransplantation nach wie vor unbefriedigend. Nach zehn Jahren arbeiten nur noch etwa 55 % der Lebendspenden und nicht mal 40 % der Kadaverspenden [8].

Im besonderen Blickpunkt des Interesses stehen daher unter anderem folgende Faktoren, die wesentlich für den eingeschränkten Erfolg der Nierentransplantation sein können:

- das Auftreten einer akuten Rejektion,
- das Auftreten einer chronischen Transplantat-Nephropathie,
- der Tod des Patienten bei funktionsfähigem Transplantat, vor allem aufgrund der Nebenwirkungen der Langzeitimmunsuppression.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Die akute Rejektion

Die meisten der akuten Rejektionsepisoden finden innerhalb der ersten Tage bis Wochen nach Transplantation statt, können aber prinzipiell auch noch Jahre später auftreten. Dabei entwickelt sich eine immunologische Reaktion des Empfängers gegen das Transplantat, die mit einem interstitiellen Ödem und einer Schädigung von Gefäßen und parenchymatösen Strukturen einhergeht und innerhalb weniger Tage zu einer zunehmenden Funktionseinschränkung des Organs führt, die man anhand des Anstiegs des Serumkreatininspiegels messen kann. Je nach klinischem Zentrum wird ein Anstieg des Serumkreatinins um 10-20 % von der „Baseline“ - dem durchschnittlich niedrigsten Wert - nach Transplantation als verdächtig angesehen [9, 10]. Fakultative klinische Zeichen wie Fieber und schmerzhafte Schwellungen des Transplantats sind seit der Einführung der modernen immunsuppressiven Medikamente nur noch teilweise zu beobachten [11].

Diagnose

Diagnostiziert wird die akute Rejektion durch die histologische Untersuchung eines Transplantatbiopsats. Bei positivem Befund findet sich eine zunehmende Infiltration des Transplantats vor allem durch mononukleäre Zellen des Transplantatempfängers wie T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Makrophagen, aber auch Granulozyten, wobei im Vollbild einer akuten Rejektion die unspezifischen Zellen überwiegen. Mit Hilfe der Kriterien der „Banff-Klassifikationen“ werden die akuten Rejektionen in verschiedene Typen unterteilt, die sowohl von prognostischer als auch von therapeutischer Bedeutung sind. Maßgebend dabei ist eine Invasion der Nierentubuli und/oder Gefäße durch inflammatorische Zellen. Die „Banff-Klassifikation“ von 1997 unterscheidet vier Typen anhand der Anzahl und der Lokalisation der infiltrierenden Zellen: 1. eine „Borderline“ Kategorie („borderline changes“), gekennzeichnet durch eine milde Tubulitis und/oder milde fokale interstitielle Entzündung; 2. eine tubulointerstitielle Rejektion (Typ I), Ia mit fokaler moderater Tubulitis, Ib mit schwerer Tubulitis; 3. eine vaskuläre Rejektion (Typ II) mit intimaler Arteriitis, wobei weiter in IIa mit milder bis moderater intimaler Arteriitis und IIb mit schwerer intimaler Arteriitis unterteilt wird;

und 4. eine schwere Rejektion (Typ III) mit transmuraler Arteriitis, fokalen Infarkten und Einblutungen [12].

Risikofaktoren

Unterschiede im Histokompatibilitätssystem der HLA-Moleküle zwischen Spender und Empfänger sowie die Präsensibilisierung des Empfängers mit präformierten Anti-HLA-Antikörpern im Serum schon vor Transplantation (prä-Tx) erhöhen die Wahrscheinlichkeit für eine akute Rejektion [13, 14].

Therapie

Eine akute Rejektion wird zumeist mit einer Hochdosis Kortikosteroide behandelt. Bei schweren akuten Rejektionen mit vaskulärer Beteiligung, die schlechter zu therapieren sind, oder bei Nichtansprechen auf Kortikosteroide können Antilymphozyten-Antikörper wie OKT3 die Rejektion beherrschbar machen. Wenn bei Verdacht auf eine akute Rejektion eine gerinnungshemmende Medikation eine Biopsie des Transplantats wegen möglicher verstärkter Blutungskomplikationen unmöglich macht, kann eine kalkulierte Gabe hochdosierter Kortikosteroide erfolgen. Ein Abfall des Serumkreatinins gibt dann einen Hinweis auf eine tatsächlich stattgefundene, therapierte akute Rejektion.

Komplikationen

Obwohl akute Rejektionen des Transplantats durch die Verwendung von neueren Immunsuppressiva generell seltener auftreten als früher (seit Einführung von Sirolimus, MMF und anti-IL2R-mAk etwa 30 %) und zum großen Teil behandelt werden können, so bleibt doch ein kleiner Teil resistent gegenüber den Therapiestrategien und führt zum Versagen der Organfunktion. Während frühe akute Rejektionen innerhalb der ersten sechs Monate noch zu über 90 % auf eine Therapie ansprechen, liegen die Erfolgchancen bei späten akuten Rejektionen nur noch bei 55-75 %. Das Auftreten einer akuten Rejektion, besonders in der Spätphase nach Transplantation, erhöht das Risiko für eine chronische Transplantatschädigung. Auch bei Patienten mit nur einer akuten Rejektionsepisode liegt die Wahrscheinlichkeit, dass das Organ ein Jahr nach Transplantation noch eine ausreichende Funktion besitzt, 15-25 % niedriger als bei Patienten ohne Rejektionsepisode [13].

Protokollbiopsien haben gezeigt, dass ein nicht unerheblicher Teil von etwa 30 % der Nierentransplantatempfänger mit stabiler Organfunktion innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation (post-Tx) inflammatorische Veränderungen im Transplantat aufweist, die den Kriterien einer akuten Rejektion Typ I nach Banff entsprechen [9]. Patienten mit unbehandelten sogenannten „subklinischen“ akuten Rejektionen innerhalb der ersten drei Monate post-Tx haben eine erhöhte Inzidenz von frühen (Monat 2 bis 3 nach Transplantation) und späten (Monat 7 bis 12 nach Transplantation) „klinischen“ akuten Rejektionen und eine schlechtere Nierenfunktion gemessen an einem höheren Serumkreatininwert nach zwei Jahren im Vergleich zu Patienten mit behandelten „subklinischen“ akuten Rejektionen [9, 15].

2.2 Die CTN- die chronische Transplantat-Nephropathie

Die chronische Transplantat-Nephropathie (CTN) ist der Hauptgrund für die Beschränkung der Langzeitfunktion der Nierentransplantate auf durchschnittlich zehn Jahre und für die Rückkehr zur Dialyse nach Transplantation [16].

Diagnose

Die CTN wird durch eine Funktionseinschränkung des Nierentransplantats mit erniedrigter glomerulärer Filtrationsrate und das unspezifische histologische Erscheinungsbild einer interstitiellen Fibrose, einer tubulären Atrophie und einer arteriellen Intimahyperplasie im Transplantatbiopsat charakterisiert und tritt frühestens drei Monate nach Transplantation auf [12]. Ähnlich wie die akute Rejektion wird sie anhand der „Banff-Klassifikation“ in drei Schweregrade unterteilt.

Pathogenese

Für die Entstehung einer CTN spielen mehrere immunologische und nichtimmunologische Faktoren eine Rolle.

Nichtimmunologische Faktoren: Chronische Einflüsse des Alters und der Erkrankungen des Spenders wie Bluthochdruck, Dyslipidämie und Diabetes mellitus können die Gewebestruktur der Niere so verändern, dass sie schon vor Transplantation histologische Veränderungen aufweist, die einer CTN ähnlich sind. Die Entwicklung einer CTN nach Transplantation ist dann wahrscheinlich [16]. Schädigungen des Transplantats im direkten Zusammenhang mit dem Transplantationsprozess (Bedeutung der Todesursache des Spenders [17, 18], der Art und Weise

der Organentnahme, der Organaufbewahrung und der Implantation und Reperfusion), die zu verzögerter Aufnahme der Transplantatfunktion führen können, sind stark negativ mit der Langzeitfunktion des Transplantats korreliert. Ebenso führen Erkrankungen wie Bluthochdruck [19, 20], Hypertriglycerinämie [21] und Diabetes mellitus des Empfängers zu Transplantatveränderungen im Sinne einer CTN. Die Größe des transplantierten Organs, das Geschlecht des Spenders und des Empfängers, Infektionen des Transplantats (z.B. CMV), eine wiederkehrende Grunderkrankung der Niere, sowie Nephrotoxizität der verwendeten Immunsuppressiva Ciclosporin A und Tacrolimus haben ebenfalls Einfluss auf die Langzeitfunktion des Organs; der direkte Zusammenhang mit der Entstehung einer CTN ist jedoch nicht vollständig geklärt [16].

Immunologische Faktoren: Ein wichtiger immunologischer Faktor, der die Entwicklung einer CTN stark begünstigt, ist das Auftreten von akuten Rejektionen, besonders zu einem späten Zeitpunkt nach Transplantation oder wenn sie schwer, wiederkehrend und schlecht therapierbar sind [22, 23]. Ebenso scheinen subklinische akute Rejektionen einen negativen Einfluss auf die Langzeitfunktion des Organs zu haben, falls sie nicht therapiert werden, wie schon weiter oben erwähnt von Rush et al. beobachtet wurde. Unterschiede im Histokompatibilitätssystem zwischen Spender und Empfänger sowie die Präsensibilisierung des Empfängers mit präformierten Anti-HLA-Antikörpern im Serum (PRA) schon vor der Transplantation sind mit schlechterer Prognose für die Langzeitfunktion des Transplantats verbunden [24, 25], ebenso eine schlechte Wirksamkeit und Noncompliance bezüglich der Immunsuppressiva. Bei einigen Patienten konnte nach Transplantation im Labor aber auch eine ständige spenderspezifische Immunreaktion nachgewiesen werden, die mit einem Fortschreiten einer CTN assoziiert war [26, 27].

Die immunologischen und nichtimmunologischen Faktoren beeinflussen sich gegenseitig. So können Verletzungen und Schäden des Transplantatgewebes zu einer unspezifischen Entzündung führen, die durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, erhöhter Expression von HLA-Molekülen auf Epithelien und Endothelien und einer Rekrutierung von antigenpräsentierenden Zellen ihrerseits mit einer Aktivierung der spezifischen Immunantwort gegen das Transplantat einhergeht [28, 29]. Es konnte daher auch gezeigt werden, dass Nierentransplantate mit verzögerter Funktion nach Peritransplantationsstress häufiger akute Rejektionen durchlitten, wobei dann die Prognose bezüglich ihrer Langzeitfunktion besonders schlecht war [30]. Auf der anderen Seite kann eine verzögerte Funktionsaufnahme der transplantierten Niere auch durch eine frühe akute Rejektion bedingt sein.

Das Zusammenspiel der immunologischen und nichtimmunologischen Faktoren führt zu einer chronischen Schädigung des Nierengewebes, die zu einem langfristigen fibrosierenden Umbau mit dem histologischen Bild der CTN und zu einer Funktionseinschränkung des Organs führen kann, welche irreversibel und nicht therapierbar sind.

2.3 Der Tod des Patienten bei funktionsfähigem Transplantat

Die Mortalität der Patienten nach Transplantation trotz funktionsfähigem Transplantat ist eine der Hauptkomplikationen, die bis heute den Erfolg von Nierentransplantationen limitieren. Dabei stehen die meisten Gründe für den Tod des Patienten in mehr oder weniger direktem Zusammenhang mit der Immunsuppression selbst.

Kardiovaskuläre Erkrankungen

Besonders Kortikosteroide und Tacrolimus, aber auch Ciclosporin A und führen zu einer Hyperglykämie, die in bis zu 20 % der Fälle einen Diabetes mellitus schon innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation auslösen kann [31], sowie zu einer Hypertonie, die bei bis zu 80 % aller nierentransplantierten Patienten behandlungsbedürftig ist [32]. Eine Hyperlipidämie, wie sie in 60-80 % [33] der Patienten nach Transplantation beobachtet wird, ist neben familiären und anamnestischen Faktoren einer immunsuppressiven Behandlung besonders mit Sirolimus [34], Kortikosteroiden und Ciclosporin A zuzuordnen. Die erhöhte Inzidenz von Anämie und Osteoporose nach Nierentransplantation ist ebenfalls zum Teil auf Nebenwirkungen immunsuppressiver Medikamente zurückzuführen [35, 36]. Diese metabolischen Nebenwirkungen können zu kardiovaskulären Störungen führen, die einerseits neben der direkten nephrotoxischen Wirkung der Calcineurininhibitoren Ciclosporin A und Tacrolimus zu einer Schädigung des Transplantats mit schweren Folgen für die Langzeitfunktion [37, 38] beitragen, andererseits die Hauptursachen für den Tod des Patienten nach Nierentransplantation darstellen [39]. Etwa ein Viertel aller Patienten entwickelt nach Transplantation eine KHK mit der möglichen Folge eines Myokardinfarktes und etwa 15 % der Patienten leiden unter peripher vaskulären Störungen mit der möglichen Folge von cerebralen Insulten oder der Ausbildung einer PAVK [40].

Tumore

Ein weiteres Problem stellt die erhöhte Inzidenz maligner Neubildungen bei nierentransplantierten Patienten unter immunsuppressiver Therapie dar. Während das Risiko für nierentransplantierte Patienten an einem Tumor zu erkranken insgesamt drei-viermal höher liegt als in der Allgemeinbevölkerung [41], kann es für bestimmte Tumoren über 100-mal erhöht sein [42]. Dabei kommt es neben der Entwicklung von Hauttumoren (bis zu 37 % aller Transplantierten), Zervixkarzinomen, hepatobiliären Karzinomen, Nierenzellkarzinomen und Sarkomen (inklusive dem Kaposi Sarkom) vor allem zu lymphoproliferativen Erkrankungen [43], wobei der Anteil von Non-Hodgkin-Lymphomen 93 % beträgt. Pathogenetisch spielt bei letzterem die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus eine große Rolle. Die Prognose ist mit einer Letalität von 40 % innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung äußerst schlecht [44, 45]. Bestimmte Tumore wie z.B. einige Lymphome oder das Kaposi Sarkom sprechen auf eine Unterbrechung der Immunsuppression an [41]. Dadurch steigt jedoch wiederum das Risiko für eine akute Rejektion des Nierentransplantats.

Infektionen

Neben dem Effekt, die spezifische Abwehr des Transplantatempfängers so zu schwächen, dass zwar das Transplantat so gut wie möglich vor immunologischen Reaktionen geschützt wird, aber auch gefährliche Neuinfektionen durch vor allem opportunistische Erreger oder Reaktivierungen bestimmter Virusinfektionen im Körper begünstigt werden, hemmen Immunsuppressiva auch die unspezifischen Abwehrmechanismen des Patienten. Daher ist die rechtzeitige Diagnose von ablaufenden Infektionen bei Transplantationspatienten ohne die sonst wegweisenden Symptome wie Fieber, Schmerzen und Schwellungen eine schwierige Aufgabe. Während zu Beginn der Transplantationsära bei bis zu 70 % aller Nierentransplantierten schwerwiegende infektiöse Komplikationen auftraten, die bei 11-40 % der Patienten tödlich endeten, beträgt die durch Infektionen bedingte Mortalität nach Nierentransplantation heutzutage weniger als 5 %. Das wurde vor allem durch veränderte chirurgische Techniken, verbesserte Immunsuppressiva und die Einführung prophylaktischer antimikrobieller Substanzen erreicht [46]. Infektionen bleiben jedoch eine der Hauptursachen für den Tod des Patienten nach Nierentransplantation. Dabei spielen in erster Linie Bakterien wie Listerien, Nocardien und Legionellen, Pilze wie Candida, Aspergillus und Cryptococcus, und Protozoen wie Pneumocystis Carinii und Toxoplasma gondii eine große Rolle. Hauptsächlich entwickeln die Patienten Pneumonien, gefolgt von Pyelonephritiden, die in schweren Fällen zu einer Sepsis führen können. Herpesviren wie CMV, EBV, HZV und VZV und Papovaviren stellen aufgrund

der großen Durchseuchung der Bevölkerung ein besonderes Problem dar. Sowohl eine Primärinfektion als auch eine Virus-Reaktivierung sind dabei von Bedeutung [47]. So kann sich eine CMV-Infektion klinisch unter vielem anderen als Enzephalitis, Meningitis, Hepatitis, Enteritis, Myokarditis oder Pneumonie manifestieren, aber auch unter dem Bild einer Myelosuppression durch eine zusätzliche Verminderung der Immunität des Patienten weiteren opportunistischen Erregern Vorschub leisten [48]. Sowohl CMV als auch EBV sind mit lymphoproliferativen Erkrankungen assoziiert, ebenso wie das Papillomavirus aus der Gruppe der Papovaviren mit der Entwicklung eines Zervixkarzinoms [44].

Die möglichen Folgen einer immunologischen Reaktion gegen das Transplantat wie die akute Rejektion und die CTN stehen in direkter Konkurrenz zu den Nebenwirkungen der immunsuppressiven Medikamente, die genau diese immunologischen Reaktionen unterdrücken sollen. Während Patienten, die eine oder mehrere akute Rejektionen erleiden, von einem Schutz ihres Transplantats durch eine Erhöhung der Immunsuppression profitieren könnten [9, 49], tolerieren andere Patienten eine niedrigere Dosierung der Immunsuppression oder den vollständigen Verzicht auf ein bestimmtes Immunsuppressivum (z.B. Steroide oder Ciclosporin A) [50, 51, 52] und würden damit weniger Nebenwirkungen in Kauf nehmen müssen. Gerade im Hinblick auf subklinische akute Rejektionen verweisen Rush et al. daher auf die mögliche Notwendigkeit wiederholter Protokollbiopsien während der frühen Posttransplantationsphase [53], die selbst jedoch durch ihren invasiven Charakter und möglichen Blutungskomplikationen einen weiteren Beitrag zur Schädigung des Transplantats leisten können. Könnte man durch die nicht- oder weniger invasive funktionelle Messung der spenderreaktiven Immunantwort vorhersagen, für welche Patienten das Risiko für eine immunologische Schädigung des Spenderorgans erhöht ist und bei welchen man die Immunsuppression minimieren kann, so wäre eine optimale, individuelle Therapieanpassung mit den wenigstmöglichen Nebenwirkungen und Risiken aussichtsreich.

2.4 Die Immunantwort

Bedeutung von T-Zellen

Obwohl antigenspezifische und unspezifische Abwehrmechanismen in komplexer Weise zusammenarbeiten, wird heutzutage angenommen, dass die akute Rejektion vor allem ein T-Zell-abhängiger und T-Zell-initiiertes Prozess ist [54]. Dafür spricht, dass die Inzidenz akuter Rejektionen seit Einführung der Calcineurinantagonisten Ciclosporin A und Tacrolimus als

Immunsuppressiva zurückgegangen ist. Calcineurinantagonisten inhibieren selektiv die Aktivierung, Zytokinausschüttung und Proliferation von T-Zellen. Ebenso ist OKT3, ein monoklonaler Antikörper gegen das CD3-Oberflächenmolekül, welches sich nur auf T-Zellen befindet, ein potentes Medikament zur Therapie von akuten Rejektionen mit zum Teil besserer Wirkung als sie hochdosierte Kortikosteroide zeigen [55].

T-Zellaktivierung

Naive T-Zellen, die gereift den Thymus verlassen haben, zirkulieren durch das Blut- und Lymphsystem. Sie werden erst aktiviert, wenn ihr T-Zellrezeptor einen körperfremden MHC-Peptid-Komplex auf einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle innerhalb eines Lymphknotens in Anwesenheit von kostimulatorischen Signalen erkennt. Dabei sind die T-Zell-Rezeptoren einer Zelle spezifisch für einen körperfremden MHC-Peptid-Komplex. Kreuzreaktionen zu anderen körperfremden MHC-Peptid-Komplexen kommen jedoch vor. MHC-Moleküle sind polymorphe membranständige Proteine, die in einer variablen Bindungsgrube bestimmte Peptide binden können, die sie den T-Zellen präsentieren. Es gibt zwei Hauptklassen von MHC-Molekülen: Während MHC-Klasse I -Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C) vor allem intrazelluläre Antigene wie virale, onkogene oder zelleigene Peptide präsentieren und auf den meisten somatischen Zellen exprimiert werden, werden durch MHC-Klasse II -Moleküle (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP), die nur in lymphoiden Geweben, auf monozytären und dendritischen Zellen, B-Zellen und vaskulärem Endothel exprimiert werden, vor allem extrazelluläre Antigene wie bakterielle Peptide oder Apoptose-Zellprodukte präsentiert. MHC-Moleküle der Klasse I werden von T-Zell-Rezeptoren der CD8^{pos}T-Zellen erkannt, MHC-Moleküle der Klasse II von T-Zell-Rezeptoren der CD4^{pos}T-Zellen. Als kostimulatorische Signale dienen Interaktionen zwischen Oberflächenmolekülen der antigenpräsentierenden Zellen (z.B. CD86, CD80, CD40) und deren Liganden auf T-Zellen (CD28, CTLA-4, CD154), wobei auch Zytokine wie IL2 für diese Rolle in Betracht kommen [56, 57].

Nach Aktivierung produziert die T-Zelle zunächst nur das Zytokin IL2 und exprimiert auf der eigenen Zelloberfläche IL2-Rezeptoren. Erst danach löst die Stimulierung der eigenen IL2-Rezeptoren durch IL2 eine Kaskade von Ereignissen aus, die zur Proliferation als auch zur weiteren Differenzierung zur Effektorzelle mit entsprechenden Effektorfunktionen anregt. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Priming“. Der ganze Prozess läuft innerhalb von Tagen ab [58, 58, 60]. Eine Effektorzelle kann dagegen nach einem erneuten Kontakt mit „ihrem“ Fremd-MHC-Peptid-Antigen-Komplex ohne weitere Kostimulation innerhalb von Minuten aktiv

werden. Kehrt eine aktivierte Zelle wieder in eine Art Ruhezustand zurück, wird sie als Gedächtniszelle bezeichnet. Gedächtniszellen brauchen zwar für ihre Reaktivierung bei erneutem Antigenkontakt zusätzliche kostimulatorische Signale, allerdings reicht ein viel kleinerer Stimulus aus, um innerhalb von Stunden in Effektorzellen zu differenzieren, zu proliferieren und Zytokine zu sezernieren [58, 59, 61]

Beide, Effektorzellen und Gedächtniszellen, oder zumindest eine Subpopulation der Gedächtniszellen, die sogenannten Effektor-Gedächtniszellen, können im Gegensatz zu naiven T-Zellen durch Expression von bestimmten Adhäsionsmolekülen (z.B. CD11a) auch durch peripheres Gewebe zirkulieren [62]. Dabei wird vermutet, dass Effektor- und Gedächtniszellen nicht unbedingt professionelle antigenpräsentierende Zellen zur Reaktivierung benötigen, sondern dass die erhöhte Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorisch wirkenden Oberflächenmolekülen auf entzündeten Endothelien in der Peripherie für die Reaktivierung ausreicht [63, 64].

Immunität gegen das Transplantat

T-Zellen erkennen körperfremde MHC-Moleküle oder MHC-Moleküle, die körperfremde Peptide präsentieren, darunter auch Peptide vonprozessierten körperfremden MHC-Molekülen. In der Transplantationsmedizin wird daher versucht, jeweils ein Organ zu finden, dass die gleichen MHC-Moleküle exprimiert wie der Empfänger - Spender und Empfänger also zu „matchen“. Dabei wird vor allem auf die MHC-Klasse I -Moleküle HLA-A und HLA-B sowie das MHC-Klasse II -Molekül HLA-DR Wert gelegt. Da die Moleküle kodominant exprimiert werden, ist ein maximales Mismatch von 6 möglich. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Inzidenz von akuten Rejektionen als auch die Langzeitfunktion des Transplantats mit der Anzahl der HLA-Mismatches korreliert ist [13, 24], was einen weiteren Hinweis für die Rolle von T-Zellen bei den immunologischen Reaktionen gegen das Transplantat gibt.

In der Frühphase nach Transplantation werden für die allogene Aktivierung der T-Lymphozyten vor allem die MHC II-exprimierenden dendritischen Zellen des Spenders im Transplantat durch die „direkte Präsentation“ fremder Peptide durch fremde MHC-Moleküle verantwortlich gemacht. Durch Abwanderung dieser antigenpräsentierenden Zellen des Spenders in das lymphoide System des Empfängers wird das Alloantigen nach und nach im gesamten Körper verteilt [65, 66]. In der Spätphase nach Transplantation dominiert die „indirekte Präsentation“ fremder Peptide durch eigene MHC-Moleküle, d.h. die Prozessierung der Fremdantigene durch

die antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers, darunter vor allem auch die Peptide fremder MHC-Moleküle, durch eigene MHC-Moleküle [67, 68].

Da die „indirekte Präsentation“ im Gegensatz zur „direkten Präsentation“ solange stattfinden kann, wie sich das Transplantat und damit Antigen im Körper des Empfängers befindet, wurde die Vermutung geäußert, dass vor allem indirekt geprimte T-Zellen für die Entwicklung einer CTN mitverantwortlich seien [26, 69, 70, 71, 72].

CD4 und CD8 sind akzessorische nichtpolymorphe Oberflächenmoleküle auf T-Zellen, die mit den invarianten extrazellulären Domänen der MHC-Klasse II- bzw. MHC-Klasse I-Moleküle interagieren. CD4^{pos} T-Zellen und CD8^{pos} T-Zellen können im Rahmen akuter Rejektionen verschiedene Funktionen zugeordnet werden:

Funktion der CD4^{pos}T-Zellen: CD4^{pos}T-Zellen, auch T-Helferzellen genannt, proliferieren nach Aktivierung, sezernieren verschiedene Zytokine wie IL2, IFN γ und TNF α und können durch Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen auf diesen eine verstärkte Expression kostimulatorischer Signale bewirken [73], wodurch eine Proliferation und Differenzierung auch der MHC I-aktivierten CD8^{pos}T-Zellen angeregt wird. Unter weiterer Zytokinproduktion (IFN γ , TNF α) erfolgt eine Rekrutierung von Makrophagen und anderen unspezifischen inflammatorischen Zellen in das Transplantat [65, 74]. Die von ihnen freigesetzten zytolytischen Proteasen und freien Radikale führen zu einer Gewebeschädigung. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass CD4^{pos}T-Zellen für das Auftreten einer akuten Rejektion essentiell sind [75, 76].

Funktion der CD8^{pos}T-Zellen: Die sogenannten zytotoxischen CD8^{pos}T-Zellen können eine direkte Gewebsschädigung auslösen, indem sie in Zielzellen mit spezifischen Fremd-MHC-Peptid-Komplex Apoptose induzieren. Dies geschieht entweder über die Sekretion von Perforin und Granzymen oder den Zell-Zellkontakt zwischen den Oberflächenmolekülen Fas-Ligand (CD95L) und Fas (CD95). Obwohl in Infiltraten von Transplantaten mit einer akuten Rejektion regelmäßig CD8^{pos}T-Zellen nachgewiesen wurden und enge Assoziationen zwischen der Expression zytotoxischer Effektormoleküle wie Perforin und Granzym B in Nierenbiopsaten und einer akuten Rejektion bestehen [77, 78], bleibt die Rolle der zytotoxischen Mechanismen bei akuten Rejektionen unklar. Zwar ist Apoptose Bestandteil der Vorgänge während einer akuten Rejektion [79, 80], jedoch ist Apoptose generell ein nichtinflammatorischer Prozess. Die Bildung von Gewebnekrosen, die mit akuten Rejektionen einhergehen, ist nur durch Inflammation und Ischämie erklärbar. Daher stehen möglicherweise auch hier die nichtzytotoxischen Effektormechanismen, vor allem die Sekretion von IFN γ im Vordergrund.

Bedeutung von IFN γ

IFN γ ist ein Zytokin, das hauptsächlich von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen sezerniert werden kann. Unter normalen Umständen werden nur sehr geringe Mengen produziert, große Mengen jedoch bei Traumata, Infektionen, malignen Neoplasien, Autoimmunität und Alloimmunität. IFN γ ist im Wesentlichen ein „proinflammatorisches“ Zytokin, das heißt, es reguliert zelluläre Vorgänge, die zu einer Inflammation führen und diese unterhalten. Auf fast allen Körperzellen befinden sich Rezeptoren für IFN γ . Zu seinen vielfältigen Wirkungen zählt die Aktivierung von Granulozyten, Makrophagen und Endothelzellen, die selbst weitere proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL6 und IL1 sezernieren können, sowie eine Hochregulation der Expression von MHC-, Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche vieler Zellen bewirken, wodurch die Präsentation von Fremdanigenen erhöht, die Aktivierung von T-Zellen und die Erkennung von antigenen Zielzellen sowie der Eintritt inflammatorischer Zellen in das Gewebe erleichtert wird. Es wird daher vermutet, dass IFN γ auch bei akuten und chronischen Rejektionen eine entscheidende Rolle spielt. So beobachteten Moudgil et al., dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer akuten Rejektion in Lungentransplantierten und der Expression von IFN γ mRNA in der Flüssigkeit einer bronchoalveolären Lavage besteht [81]. Van Besouw et al. testeten die Zytokinsekretion von Lymphozyten, die nach Herztransplantation das Organ infiltriert hatten, wenn sie mit Spenderzellen stimuliert wurden, und fanden innerhalb der ersten 90 Tage post-Tx eine signifikant höhere IFN γ -Sekretion in Lymphozytenkulturen, die von Biopsien während einer akuten Rejektion stammten, im Vergleich zu Lymphozyten aus Kulturen einer Biopsie ohne akute Rejektion [82]. Nagano et al. berichteten wiederum, dass bei Herztransplantationen in IFN γ -Knockout-Mäusen die Rate und Schwere arterioskleroser Koronarveränderungen im Sinne einer chronischen Rejektion/Schädigung wesentlich niedriger war als beim Wildtyp. Ähnliches galt für die Verwendung von anti-IFN γ -mAk [83].

Gedächtniszellen und Effektorzellen

Im Gegensatz zu Effektor-T-Zellen, die nach Aktivierung nach wenigen Tagen durch Apoptose sterben (activation induced cell death-AICD) [84], können Gedächtnis-T-Zellen mehrere Jahre überleben, wobei die Bedingungen für ihre Langlebigkeit, wie etwa permanente spezifische oder unspezifische Antigenstimulation, bestimmte Zytokine oder andere Faktoren, nicht vollständig geklärt sind. Die große Anzahl immunologischer Stimulationen, denen der Mensch durch vielfältige Antigene ausgesetzt ist, z.B. virale oder bakterielle Infektionen, Impfungen, Bluttransfusionen und Schwangerschaften, generiert im Laufe des Lebens eine Unmenge von

Gedächtnis-T-Zellen gegen die verschiedensten Antigene. Einige dieser Zellen können mit unterschiedlichen Antigenen kreuzreagieren, wodurch es zu einer Präsensibilisierung eines Organempfängers gegen sein Transplantat kommen kann, ohne dass der Empfänger vor der Transplantation Kontakt mit dem entsprechenden Antigen gehabt hat [85, 86, 87].

Es gibt messtechnisch wenig Möglichkeiten Effektor-T-Zellen und aktivierte Gedächtnis-T-Zellen voneinander zu trennen [88]. Beide unterscheiden sich aber von naiven T-Zellen dadurch, dass sie in wesentlich kürzerer Zeit mit einem Mindestmaß an Antigen- und Kostimulation auch in peripheren Geweben aktiviert werden können und dass sie die Fähigkeit besitzen eine breite Palette von Zytokinen zu sezernieren. Sie sind daher in der Lage, das Transplantat direkt zu attackieren und so eine akute Rejektion auszulösen [89].

Die Messung alloreaktiver Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen könnte daher Auskunft über die momentane Aktivierung des Immunsystems des Empfängers gegen das Transplantat geben, und zwar sowohl vor wie nach der Transplantation.

2.5 Das ELISpot-Assay - Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay

In der Vergangenheit gestaltete sich die Messung alloreaktiver T-Zell-Frequenzen schwierig. Traditionell wurden alloreaktive T-Zellen durch die Messung der proliferativen Antwort in einer „Mixed Lymphocyte Reaction“ (MLR) gemessen. Dabei wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut von zwei Individuen für sechs bis sieben Tage zusammen inkubiert, wobei die Mitose der stimulierenden Zellen durch eine Bestrahlung oder Behandlung mit Mitomycin C verhindert wurde, während die Responderzellen unbehandelt blieben. Diese Methode gab jedoch keine Auskunft über die Anzahl und Funktion der Zellen. Somit waren auch gemessene Zusammenhänge zwischen alloreaktiver Antwort in vitro und Transplantatprognose inkonsistent [90, 91, 92]. Die Methode der „Limiting Dilution Analysis“ (LDA) kann alloreaktive T-Zellen quantifizieren. Sie berechnet dafür die statistische Wahrscheinlichkeit von Responderzellen verschiedener Konzentrationen unter Stimulation zu proliferieren und Effektorfunktion zu erlangen. Die sehr aufwendige Arbeitsweise, die schlechte Standardisierung und die langen Inkubationszeiten stellen einerseits ein Hindernis für die routinemäßige Nutzung dar, können aber andererseits auch Artefakte produzieren z.B. durch Zellklone mit höherer Proliferationsaktivität und relativer Resistenz gegenüber aktivierungsinduzierter Apoptose [93]. Außerdem kann man mit den meisten Varianten der LDA eine Unterscheidung zwischen naiven und geprimten Zellen nicht treffen. Einen weiteren möglichen Ansatz zur Messung

antigenspezifischer T-Zellen bietet die intrazelluläre Zytokinfärbung. Nach Antigenstimulation bilden die spezifischen T-Zellen Zytokine (z.B. $\text{IFN}\gamma$, welche durch Sekretionsinhibitoren im Innern der Zelle festgehalten werden. Durch die zusätzliche Markierung des Zytokins mit einem fluoreszierenden Farbstoff kann die Anzahl der markierten Zellen im Durchflusszytometer erfasst werden. Da die Messschwelle der Durchflusszytometrie bei über $1/10^4$ Zellen liegt, ist die Methode zur Messung alloreaktiver T-Zellen möglicherweise nicht geeignet und bisher auch nicht erfolgreich angewandt worden. Die Weiterentwicklung des ELISpot-Assays durch Heeger et al. [1] ermöglichte daher erstmals die Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer, zytokinproduzierender Zellen innerhalb relativ kurzer Zeit selbst auf einem so niedrigen Niveau wie $1/10^6$ Zellen.

Heeger et al. konnten kürzlich mit Hilfe des ELISpot-Assays zeigen, dass man Effektor- und Gedächtniszellen von naiven Zellen anhand ihres Zytokinprofils zu einem bestimmten Zeitpunkt unterscheiden kann. Während geprimte T-Zellen nach Aktivierung innerhalb von 24 h neben geringen Mengen IL2 vor allem je nach Subspezifizierung $\text{IFN}\gamma$, IL4 , IL5 oder andere Zytokine produzieren, können naive Zellen in dieser Zeit nur IL2 sezernieren [58, 94].

Auf diese Art konnten sie die Anzahl $\text{IFN}\gamma$ -produzierender, spenderreaktiver Zellen bei Patienten vor Nierentransplantation messen. Heeger et al. konnten zwischen der Anzahl der $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen und dem HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger keinen Zusammenhang finden. Allerdings fiel auf, dass Patienten mit besonders hohen Werten für $\text{IFN}\gamma$ -produzierende, spenderreaktive Zellen eine frühe akute Rejektion erlitten, während Patienten, bei denen man vor Transplantation keine $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden, spenderreaktiven Zellen nachweisen konnte, rejektionsfrei blieben [95]. Man vermutete daher, dass die gemessenen Zellen Ausdruck des immunologischen Gedächtnisses im Sinne von schneller aktivierbaren Gedächtnis-T-Zellen seien, die bei früherem spenderunspezifischen Antigenkontakt generiert worden waren und nun durch Kreuzreaktion mit dem Spendergewebe zu einer Schädigung des Transplantats führten. Ähnlich wie präformierte Antikörper des Empfängers gegen HLA-Moleküle des Spenders (PRA) zu einer hyperakuten Rejektion führen, könnten spenderreaktive Gedächtniszellen zu einer Sensibilisierung des Empfängers gegen das Spenderorgan vor der Transplantation und zu einer akuten Rejektion des Transplantats nach der Transplantation führen.

3 Aufgabenstellung

Um einen Transplantatverlust und chronische Folgeschäden durch die Aktivierung des Immunsystems gegen das Transplantat zu verhindern, ist die Erfassung von immunologischen Risikofaktoren vor der Transplantation und die frühzeitige Diagnosestellung und Therapieeinleitung akuter Rejektionen nach der Transplantation besonders wichtig. Somit werden heutzutage Empfänger/Spender-Konstellationen bei denen der Transplantatempfänger bereits präformierte Antikörper gegen das Spenderorgan aufweist erfasst und vermieden, um eine hyperakute Rejektion und den durch Komplementreaktion und arterieller Mikrothrombosierung hervorgerufenen schnellen Transplantatverlust zu verhindern. Nach der Transplantation wird durch die regelmäßige Messung von Parametern aus Blut und Urin (z.B. Serumkreatinin) versucht, durch die Funktion der Niere auf mögliche immunologische Schädigungen zu schließen, die gegebenenfalls immunsuppressiv behandelt werden müssen. Das hat zum Nachteil, dass einerseits die immunologische Aktivität gegen das Transplantat erst erkannt wird, wenn die Schädigung zu einem möglicherweise nicht reversiblen Funktionsverlust der Niere geführt hat, andererseits diese bei uneingeschränkter Funktion nicht bemerkt und somit eventuelle Spätfolgen nicht verhindert werden können. Die routinemäßige Nierenbiopsie stellt wegen des einhergehenden Verlustes von Nierengewebe und den möglichen schweren Blutungskomplikationen gerade bei Patienten mit zusätzlicher gerinnungshemmender Medikation keine Alternative dar.

Obwohl T-Zellen als Initiatoren und Vermittler einer akuten Rejektion eines Transplantats gelten, werden spenderspezifische Effektor-T-Zellen routinemäßig bei Nierenpatienten bisher weder vor Transplantation noch im Verlauf nach der Transplantation gemessen. Möglicherweise würde aber gerade eine hohe Anzahl spenderspezifischer Effektor-T-Zellen im Blut des Patienten vor Transplantation als Ausdruck einer zellulären Sensibilisierung einen Risikofaktor für eine nach Transplantation auftretende akute Rejektion darstellen (wie von Heeger et al. vermutet [95]). Falls der Anstieg spenderspezifischer Effektor-T-Zellen nach Transplantation einen Hinweis auf eine immunologische Schädigung des Transplantats lieferte, könnten so eventuell klinische akute Rejektionen früher erkannt und subklinische akute Rejektionen überhaupt diagnostiziert und therapiert werden. Zusätzlich könnte der Erfolg therapeutischer Strategien zur Hemmung/Eliminierung von Effektor- und Gedächtniszellen besser überwacht werden.

In dieser Arbeit wurden daher zwei Ziele verfolgt:

1. Die Anzahl spenderspezifischer, IFN γ -produzierender Effektor-T-Zellen im peripheren Blut von Nierenpatienten sollte im ELISpot-Assay vor und nach der Nierentransplantation gemessen und in Beziehung zu frühen akuten Rejektionen und zur Transplantatfunktion gesetzt werden. Dabei wurde ein Hauptmesszeitraum von drei Monaten post-Tx gewählt, da es galt, einen möglichst frühen prognostischen Marker zu untersuchen, und da in dieser Zeit nach klinischer Erfahrung die meisten akuten Rejektionen aber auch möglicherweise transplantatschädigende, subklinische Rejektionen [9, 15] auftreten. Die Nierenfunktion wurde nach sechs Monaten und nach einem Jahr post-Tx untersucht, da sie zu diesen Zeitpunkten schon als sehr prädiktiv für die Langzeitfunktion des Organs gilt [2]. Zusätzlich wurde der Zusammenhang mit immunologisch sensibilisierenden Faktoren wie der Anzahl der vorangegangenen Bluttransfusionen, Transplantationen, Schwangerschaften, der CMV-Serologie von Empfänger und Spender, dem HLA-Mismatch zwischen Empfänger und Spender und der Hämodialysedauer der Patienten analysiert und der Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapieschemata und der Art der Nierenspende untersucht. Ebenfalls gingen der Nachweis von panelreaktiven Antikörpern (PRA) als Ausdruck einer humoralen Sensibilisierung sowie einer verzögerten Primärfunktion des Transplantats als Hinweis auf eine mögliche sehr frühe akute Rejektion in die Analyse mit ein.
2. Da zum Zeitpunkt der Arbeit noch keine Daten über die Reproduzierbarkeit und Variabilität des ELISpot-Assays vorlagen, sollten Variationskoeffizienten für die Messung antigen-(CMV-)spezifischer und alloreaktiver T-Zellen bestimmt werden. Im Hinblick auf eine mögliche spätere klinische Anwendung wurde außerdem der Versuch unternommen, das ELISpot-Assay methodisch zu optimieren. Daher wurden verschiedene Verfahren ausgetestet, die eine Inhibition der IFN γ -Sekretion durch die Spenderzellen hätten bewirken können. Zu den verwendeten Methoden gehörten die Behandlung der Stimulatorzellen mit den Calcineurininhibitoren Ciclosporin A und Tacrolimus sowie die Depletion der T-Lymphozyten aus den Spenderzellen mit Hilfe magnetischer Anti-CD2-Mikrobeads. Der Einfluss der in der Patientenstudie verwendeten Bestrahlung mit 30 Gray sollte ebenfalls analysiert werden. Weiterhin wurde untersucht, ob die in der Patientenstudie im Assay verwendeten Zellkonzentrationen für die Fragestellung optimal waren oder ob sich andere Konzentrationen als geeigneter für das Verfahren erwiesen.

4 Methoden

Studiendesign

Die Patientenstudie wurde mit Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Charité Berlin durchgeführt. Sie war als prospektive, beobachtende Studie angelegt.

52 Patienten, die zwischen Juni 2001 und Mai 2002 in der Charité, Campus Virchow, nierentransplantiert wurden, wurden in die Studie eingeschlossen.

Wenn organisatorisch möglich, wurden im Rahmen eines stationären Aufenthaltes in der Charité oder zu Routineuntersuchungszeitpunkten in der Transplantationsambulanz der Charité direkt vor der Nierentransplantation und vor Anfang einer Immunsuppression, am Tag 1, danach wöchentlich bis Woche 12 von jedem Patienten (in Einzelfällen auch etwa 6-7 Monate post-Tx) 20 ml venöses Vollblut unter Verwendung von Zitratmonovetten abgenommen und am gleichen Tag PBMZ präpariert.

Spenderzellen bei Kadaverspenden wurden am Tag der Transplantation aus einem Stück Milz des Spenders, welches vom HLA-Labor der Charité zur Verfügung gestellt wurde, und bei Lebendspenden aus 500 ml venösem Spenderblut eine Woche vor der Transplantation präpariert. Einige Spenderzellen wurden daraufhin im ELISpot-Assay eingesetzt, die anderen wurden kryo-konserviert, um bei späteren Messzeitpunkten zur Verfügung zu stehen.

PBMZ der Empfänger wurden zu den genannten Zeitpunkten mit frischpräparierten oder kryokonservierten Spenderzellen im ELISpot-Assay stimuliert und die Anzahl resultierender IFN γ -Spots gemessen, welche als Ausdruck aktivierter, spenderreaktiver T-Zellen des Patienten gewertet wurden. Da das Spenderzellmaterial limitiert war, konnte nicht bei allen 52 Patienten zu jedem genannten Zeitpunkt eine Messung durchgeführt werden.

Immunologisch sensibilisierende Charakteristika der Patienten wurden vor Transplantation, eine verzögerte Funktionsaufnahme des Organs sowie akute Rejektionsepisoden innerhalb der ersten sechs Monate post-Tx wurden nach Transplantation erfasst. Etwa sechs und 12 Monate nach Transplantation wurde mit Hilfe der MDRD-Formel und der zu diesen beiden Zeitpunkten im klinischen Labor ermittelten Werte für Serumkreatinin, Serumharnstoff und Albumin die GFR der Spenderniere der Patienten abgeschätzt, da die GFR die Nierenfunktion besser widerspiegelt

als das schneller zu bestimmende Serumkreatinin. Die GFR eines gesunden Menschen mit zwei funktionstüchtigen Nieren beträgt etwa 85-135 ml/min/1,73m² (altersabhängig). Ein Anstieg des Serumkreatinins aus dem Normbereich (0,5-1,2 mg/dl, abhängig von Muskelmasse, Stoffwechsel, Labor) ist jedoch erst bei einer pathologischen Verminderung der GFR um mindestens 50 % zu erwarten.

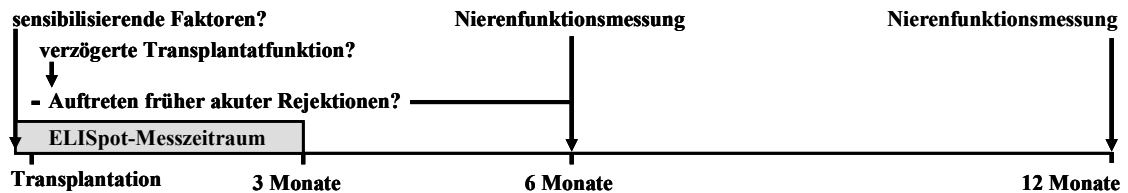


Abbildung 1 Studiendesign

Für methodische Untersuchungen wurde gesunden Probanden venöses Vollblut abgenommen.

Zellpräparation

Präparation mononukleärer Zellen aus Zitratblut

1. 20 ml Zitratblut wurden mit PBS im Verhältnis 1:1 in einem 50 ml-Röhrchen verdünnt.
2. In 14 ml -Röhrchen wurden je 3 ml des Lymphozytentrenmediums Ficoll-Paque vorsichtig mit je 8ml des verdünnten Zitratblutes überschichtet.
3. Die Röhrchen wurden bei Raumtemperatur und 1000 g für 20 min zentrifugiert. Dabei bildeten sich 4 Phasen aus: Ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten, darüber eine Schicht mit Lymphozytentrenmedium, auf der sich ein dünner, weißer Ring mit mononukleären Zellen befand. Die oberste Schicht bestand aus Plasma und Zellfragmenten.
4. Mit einer Pasteur-Pipette wurde der weiße Ring möglichst vollständig abgesaugt und in ein 50 ml Röhrchen überführt.
5. In diesem Röhrchen wurden die mononukleären Zellen zweimal mit 50 ml PBS gewaschen und bei Raumtemperatur und 200 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und jeweils verworfen.
6. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, vorsichtig resuspendiert, auf $3-5 \cdot 10^6$ /ml eingestellt und über Nacht im Brutschrank gelagert.

Präparation mononukleärer Zellen aus Spendermilzanteilen

1. Das kleine Stück Spendermilz wurde aus seinem Kulturmedium entfernt und auf einer sterilen Zellkulturschale von seiner Kapsel und Bindegewebssträngen befreit und in etwa kirschgroße Stücken geschnitten.
2. Die Milzstückchen wurden mit Hilfe eines sterilen Einmalspritzenstempels durch einen 100 µm Maschenfilter (Cellstrainer) in 50 ml Röhrchen gedrückt, wobei häufig mit PBS gespült wurde. Die Filter mit Geweberesten wurden verworfen.
3. Die Zellsuspension wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt.
4. In 50 ml Röhrchen wurden je 15 ml Lymphozytentrennmedium Ficoll-Paque mit 35 ml Milzzellsuspension überschichtet.
5. Die Röhrchen wurden nun bei Raumtemperatur und 1000 g für 20 min zentrifugiert. Dabei bildeten sich erneut 4 Phasen aus (siehe oben).
6. Der weiße Ring auf dem Lymphozytentrennmedium wurde wieder möglichst vollständig abgesaugt und in 50 ml Röhrchen überführt.
7. In diesem Röhrchen wurden die mononukleären Zellen zweimal mit 50 ml PBS gewaschen und bei Raumtemperatur und 200 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und jeweils verworfen. Manchmal neigten die Zellen zu Verklumpungen und mussten zwischendurch erneut durch einen 100 µm Maschenfilter (Cellstrainer gedrückt werden).
8. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert, in Zellkulturflaschen in Kulturmedium aufgenommen, auf $3 - 5 \cdot 10^6$ /ml eingestellt und über Nacht im Brutschrank gelagert.

Zellzahlbestimmung

Zählen von frisch präparierten, vitalen Zellen:

1. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 190 µl 3 % Essigsäure in Mikrotiterplatten verdünnt.
2. Deckgläser wurden angefeuchtet und gegen die Neubauer-Zählkammer gedrückt bis sogenannte Newton'sche Ringe entstanden.
3. 10 µl der verdünnten Zellsuspension wurden in die Zählkammer eingefüllt.
4. Die hellen, leuchtenden Zellen wurden unter dem Mikroskop in 4 Quadranten gezählt.

Erythrozyten werden bei dieser Methode durch Essigsäure lysiert. Nichtvitale Zellen leuchten zwar auch hell, durch die Präparation werden jedoch zuvor die meisten nichtvitalen Zellen aus der Zellsuspension entfernt.

Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus: $\text{Mittelwert} \cdot 20 \cdot 10^4 = \text{Zellen/ml}$

Zählen von aufgetauten, potentiell nichtvitalen Zellen:

Statt Essigsäure wurde 1 % Trypanblau verwendet.

Nichtvitale Zellen werden bei dieser Methode blau. Erythrozyten leuchten zwar auch hell, durch die Kryokonservierung werden jedoch die meisten Erythrozyten zerstört.

Kryokonservierung von Spenderzellen

Einfrieren von Spenderzellen:

1. Die am Tage zuvor präparierten Spendermilzzellen oder Spender-PBMZ wurden aus dem Brutschrank genommen und die Zellzahl bestimmt.
2. In 50 ml Röhrchen wurden die Zellen bei 200 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Das Röhrchen mit dem Zellpellet wurde auf Eis gelagert.
3. Das Pellet wurde in eiskaltem Kryomedium (hitzeinaktiviertes FKS+10% DMSO) folgenden Volumens resuspendiert: $\text{Gesamtzellzahl}/12 \cdot 10^6 \cdot 1,8 \text{ ml}$.
4. Die Zellsuspension wurde auf Eis zu je 1,8 ml in Kryoröhrchen aliquotiert.
5. Die Kryoröhrchen wurden in Iso-Propylalkohol-Gefriergefäßen bei -84 °C eingefroren.

Auftauen von kryokonservierten Spenderzellen

1. Die Kryoröhrchen mit den aufzutauenden Zellen wurden aus dem Tiefkühler herausgenommen und auf Eis gelagert.
2. Im 37 °C Wasserbad wurden sie so lange aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eisrest übrig blieb, danach wurden sie sofort wieder auf Eis gelagert.
3. Mit einer Pipette wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt.
4. Auf Eis gelagert wurde zunächst langsam, tropfenweise später etwas großzügiger eiskaltes Kulturmedium hinzugegeben bis eine Verdünnung des Kryomediums von mindestens 1:10 erreicht worden war.

ELISpot-Assay

Prinzip: Für dieses Assay werden 96-Well Platten mit einer synthetischen, weißen Membran am Boden der Wells benutzt. Die Membran wird mit Primärantikörpern gegen das interessierende sezernierte Zytokin (z.B. $\text{IFN}\gamma$) beschichtet (**a**). Dann wird eine definierte Anzahl von Immunzellen (z.B. PBMZ der Transplantatempfänger) zusammen mit einem Antigenstimulus (z.B. inhibierte Leukozyten des Transplantatspenders) in die einzelnen Wells pipettiert (**b**). Wenn die Immunzellen auf den Stimulus reagieren, produzieren sie Zytokine, die direkt neben ihnen vom Primärantikörper festgehalten werden bevor sie sich im Well verteilen oder von anderen Zellen absorbiert werden können (**c**). Nach einer bestimmten Zeit (z.B. 24 h) werden die Zellen und das Antigen aus den Wells herausgewaschen (**d**) und ein biotinylierter Sekundärantikörper gegen das interessierende Zytokin hinzugefügt, der nur an Stellen, an denen das Zytokin gebunden wurde, haften bleibt (**e**). Der überschüssige Rest wird ausgewaschen. Streptavidin, welches eng an Biotin bindet, führt nach Zugabe über eine enzymatische Reaktion zur Ausfällung eines Chromogens (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol) an den Stellen, an denen Zellen das interessierende Zytokin gebildet haben (**f**). Kleine Flecken, die sogenannten „Spots“, werden dort sichtbar.

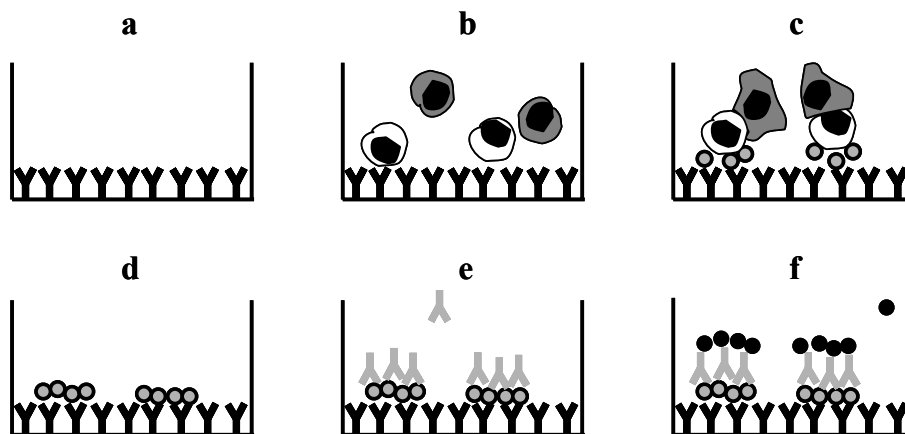


Abbildung 2 Schema zum Mechanismus des ELISpot-Assays

Ein spezielles computergestütztes Gerät (Bioreader) zählt die Anzahl der Spots über eine Kamera, die der Anzahl der zytokinsezernierenden Zellen entspricht.

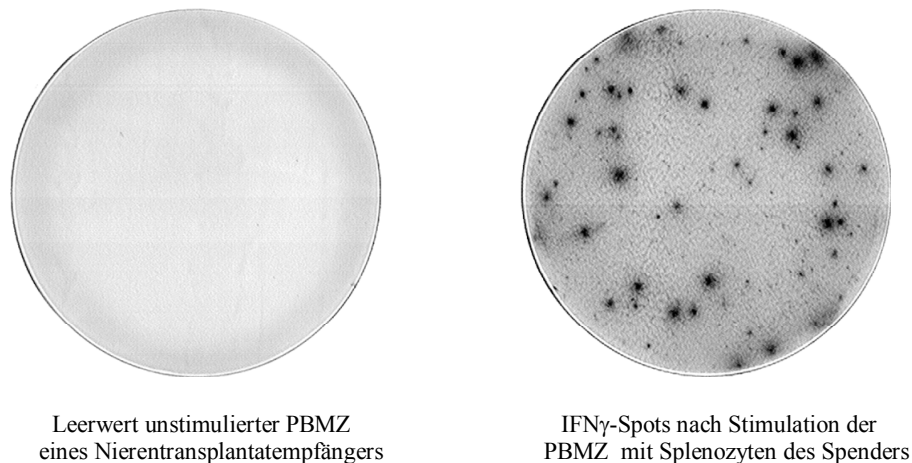


Abbildung 3 Kamerablick auf IFN γ -Spots spenderreaktiver Zellen im ELISpot-Assay

Als Antigene für die Aktivierung von T-Zellen kommen sowohl spezifische als auch unspezifische Substanzen in Frage:

- Fremd-MHC-Peptid-Komplexe oder fremde präsentierte Peptide auf der Oberfläche von Stimulatorzellen aktivieren Effektorzellen via T-Zell-Rezeptor.
- Superantigene wie PHA, ConA oder SEB können über eine direkte Bindung an den T-Zell-Rezeptor an einem Ort, der nicht für die MHC-Komplex-Bindung zuständig ist, unabhängig von einer Kostimulation eine Aktivierung der T-Zelle auslösen.
- Peptide bestimmter Länge, die zu den zu untersuchenden Immunzellen gegeben werden, können bei einem Peptidüberschuss kompetitiv die zelleigenen Peptide aus der Bindungsgrube der MHC-Komplexen verdrängen und ersetzen. Nun präsentieren die zu untersuchenden Zellen auf ihren MHC-Molekülen Fremdpeptide, die wiederum spezifische T-Zellen der untersuchten Zellpopulation aktivieren und zur Zytokinproduktion anregen können.

Während die zweite Möglichkeit, z.B. die Stimulation der Leukozyten mit PHA (PHA aktiviert T-Zellen unspezifisch über die Kreuzvernetzung ihrer CD3-Moleküle. Die resultierende IFN γ -Sekretion dient somit als Kontrolle der Messbarkeit aktivierter T-Zellen im Assay.) als Positivkontrolle des Assays fungieren kann, eignet sich das letzte Verfahren z.B. dazu, die Frequenz CMV-spezifischer Effektor-T-Zellen anhand der Reaktion auf die Präsentation verschiedener Peptide des pp65-Proteins, welches von CMV gebildet wird, zu messen.

Durchführung: Die Behandlung aller Zellen, die im ELISpot-Assay eingesetzt wurden, erfolgte vor bzw. während der Inkubation im Assay unter sterilen Bedingungen.

Tag 1:

1. Die PBMZ der zu untersuchenden Person wurden aus 20 ml Zitratblut präpariert, auf $3\text{-}5 \cdot 10^6/\text{ml}$ in Kulturmedium eingestellt und über Nacht im Brutschrank gelagert.
2. Die 96-Well Multiscreen-Mikrotiterplatte wurde mit einer 12-Kanal-Pipette mit Primär-IFN γ -Antikörpern in sterilem PBS beschichtet (3 μg Primärantikörper/ml PBS; 100 μl /Well) und über Nacht in Frischhaltefolie eingewickelt und für mindestens 8 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Tag 2:

1. Die mit Antikörpern beschichtete Platte wurde dreimal mit einer 12-Kanal-Pipette mit 200 μl PBS/Well gewaschen und auf trockenen Papiertüchern ausgeklopft. Anschließend wurde die Platte für 1-4 h bei Raumtemperatur mit „Blocking Solution“ (PBS-BSA, 200 μl /Well) mit Hilfe einer Mehrkanal-Pipette „geblockt“.
2. Die PBMZ der zu untersuchenden Person aus dem Brutschrank wurden auf $3 \cdot 10^6/\text{ml}$ Kulturmedium eingestellt.
3. Die Spendermilzzellen/-PBMZ wurden in 50 ml Röhrchen aufgetaut und anschließend im Blutbestrahlungsgerät mit 30 Gray bestrahlt***. Dabei zeigte sich, dass eine Bestrahlung auf Eis eine ungewollte IFN γ -Produktion vermindert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (beim ersten Mal auf 50 ml mit PBS aufgefüllt, beim zweiten mal mit 50 ml PBS) und für jeweils 10 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert und auf $3 \cdot 10^6/\text{ml}$ eingestellt.
4. Nach dem Blocken wurde die Platte dreimal mit 200 μl PBS/Well gewaschen und auf trockenen Papiertüchern ausgeklopft.

Die Stimulationsansätze auf der Platte wurden immer als Doppelansatz geführt mit einem Gesamtvolumen von 200 μl /Well. Es wurden pro untersuchter Person und Untersuchungstag:

- eine Negativkontrolle der Responderzellen (zwei Wells mit je 100 μl Kulturmedium plus 100 μl PBM-Zellsuspension; Gesamtzellkonzentration: $3 \cdot 10^5/\text{Well}$),
- eine Negativkontrolle der Stimulatorzellen (zwei Wells mit je 100 μl Kulturmedium plus 100 μl Spendermilzzellsuspension; Gesamtzellkonzentration: $3 \cdot 10^5/\text{Well}$),

- eine Positivkontrolle der Responderzellen (zwei Wells mit je 100 μ l PHA-Lösung einer Konzentration von 20 μ g PHA/ml plus 100 μ l PBM-Zellsuspension; Gesamtzellkonzentration: $3 \cdot 10^5$ /Well; Gesamt-PHA-Konzentration: 10 μ g/ml)
- ein Stimulationsansatz der Responder- und Stimulatorzellen im Verhältnis 1:1 (zwei Wells mit je 100 μ l PBM-Zellsuspension plus 100 μ l Spendermilzzellsuspension; Gesamtzellkonzentration: $6 \cdot 10^5$ /Well)

angesetzt. Dabei wurden die Ansätze pro Well jeweils mit einer neuen, sterilen Pipettenspitze vorsichtig durchmischt um später eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Boden des Wells zu erzielen.

5. Die Platte wurde nun mit Frischhaltefolie umwickelt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Inkubationszeit lag beim IFN γ -ELISpot-Assay bei 24 h.

Tag 3:

1. Die Platte wurde aus dem Brutschrank genommen, ausgeklopft und dreimal mit einer 12-Kanal-Pipette mit 200 μ l PBS/Well gewaschen, wieder auf trockenem Papier ausgeklopft und dreimal mit 200 μ l PBS-Tween/Well (Washing Solution) erneut gewaschen.
2. Vor dem letzten Ausklopfen ließ man das PBS-Tween bei Raumtemperatur für 10 min einwirken.
3. 100 μ l biotinylierter IFN γ -Sekundärantikörper/Well wurden in einer Konzentration von 2 μ g/ml PBS mit einer Mehrkanal-Pipette hinzugegeben.
4. Die Platte wurde über Nacht, jedoch mindestens 4 h, im Kühlschrank bei 4 °C in Frischhaltefolie eingewickelt inkubiert.

Tag 4:

1. Die Platte wurde aus dem Kühlschrank genommen, ausgeklopft und viermal mit 200 μ l PBS-Tween/Well gewaschen und auf trockenem Papier ausgeklopft.
2. 100 μ l Streptavidin/Well wurden in einer 1:2000 fachen Verdünnung in PBS-BSA-Tween hinzugegeben und für 2-4 h bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Anschließend wurde die Platte je dreimal mit 200 μ l/Well PBS-Tween und PBS gewaschen und ausgeklopft.

4. In jedes Well der Platte kamen 200 µl „Visualisierungslösung“. Sie musste stets frisch kurz zuvor aus AEC-Lösung und AEC-Puffer zubereitet werden: AEC-Lösung und AEC-Puffer wurden im Verhältnis 1:30 vermischt, durch einen 0,45 µm-Filter gegeben. Ein 2000stel des AEC-Puffervolumens H₂O₂ wurde hinzugefügt.

Unter Einwirkung des AECs entwickelten sich in den Wells rosafarbene Punkte (Spots) an den Stellen, an denen sich zuvor eine IFN γ -produzierende Zelle befand. Die Entwicklung dauerte 1-5 min. Bevor sich der Hintergrund des Wells ebenfalls rosa färbte, wurde die Reaktion durch Spülung mit Aqua dest. gestoppt.

Die Unterseite der Platte wurde entfernt, damit die Bodenmembran der Wells an der Luft trocknen konnte. Anschließend wurde die Platte mit Hilfe des BIOreaders ausgewertet, der die Punkte (Spots) pro Well zählte. Aus jedem Doppelansatz wurde der Mittelwert errechnet.

*****Nur für methodische Untersuchungen wurden PBMZ von Probanden oder Spendermilzzellen vor Stimulationsbeginn wie folgt behandelt:**

- Es folgte keine Behandlung.
- Die Zellen wurden mit 30 Gray bestrahlt und anschließend zweimal in PBS gewaschen.
- Die Zellen wurden für 30 min, 60 min, 90 min, 120 min oder 24 h mit 1000 ng/ml Ciclosporin im Brutschrank inkubiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen.
- Die Zellen wurden für 2 h mit 200 ng/ml Tacrolimus im Brutschrank inkubiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen.
- CD2-positive Leukozyten wurden mittels MACS (Magnetic Cell Sorting) aus dem Stimulatorzellgemisch entfernt (CD2-depletiert).
- Die Zellen wurden CD2 depletiert, mit 30 Gray bestrahlt und anschließend zweimal in PBS gewaschen.

Um den Einfluss dieser Maßnahmen auf die IFN γ -Sekretion der Zellen zu überprüfen, wurden sie mit 1 µg/Well pp65-Gesamtpeptidmischung, 10 µg/Well PHA oder ebenso behandelten Leukozyten anderer Probanden stimuliert. Näheres Abschnitt 6.5.

CD2^{pos}Zelldepletion durch MACS - Magnetic Cell Sorting

Prinzip: Zellen mit bestimmtem Oberflächenmolekülen können durch dafür spezifische magnetische Antikörper markiert werden. Nur diese markierten Zellen werden dann in einer aus Eisenkügelchen bestehenden Säule in einem Magnetfeld festgehalten, während alle Zellen ohne

diese entsprechenden Oberflächenmoleküle mit Hilfe eines Fließmediums (MACS-Puffer, PBS) ungehindert hindurchgelangen. CD2 ist ein Oberflächenmolekül, welches sich auf T-Lymphozyten, Thymozyten und Natürlichen Killerzellen befindet. Durch die Depletion CD2^{pos} Leukozyten können alle IFN γ -produzierenden Zellen aus einem Leukozytengemisch entfernt werden.

Durchführung:

1. Die frisch präparierten mononukleären Zellen wurden gezählt, mit PBS gewaschen, für 10 min bei 200 g zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen und verworfen.
2. Das Pellet wurde in einem Gesamtvolumen von 40 μ l MACS-Puffer/ 10^7 Zellen resuspendiert und mit 10 μ l CD2-Hapten-Antikörper (Miltenyi) pro 10^7 Zellen für 15 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.
3. Danach wurden 30 μ l MACS-Puffer/ 10^7 Zellen und 20 μ l Anti-Hapten-MicroBeads-FITC/ 10^7 Zellen hinzugefügt, gut durchgemischt (Schüttler) und die Zellen für 20 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.
4. Ab jetzt musste möglichst schnell und kühl/auf Eis gearbeitet werden, um eine erneute unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern.
5. Die Zellen wurden mit dem 20-fachen Färbevolumen MACS-Puffer gewaschen, bei 300 g für 10 min bei 4 °C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Zellpellet in 500 μ l kaltem MACS-Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert.
6. Der MidiMACS-Magnet wurde an dem Magnetständer befestigt, eine LD-MACS-Säule für Zelldepletion wurde in den Magneten gehängt und mit 2 ml MACS-Puffer gespült (dabei sollte der Puffer nur durchtropfen, nicht durchgedrückt werden).
7. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette durch einen Prä-Separationsfilter auf die Säule gedrückt, durch die sie tropfenweise durchlief und unterhalb der Säule in einem Röhrchen als CD2-Negativfraktion aufgefangen wurde. Anschließend wurde die Säule mit 3 ml MACS-Puffer gespült, der ebenfalls als Negativfraktion aufgefangen wurde.
8. Die Negativfraktion wurde in PBS gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Die Reinheit konnte durchflusszytometrisch kontrolliert werden.

Messung des Anteils der T-Zellen in PBMZ

Prinzip: Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung von Zellen anhand spezifischer Antigene, die durch die Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern erfasst

werden können. Die zu messenden Zellen werden in den Strahlengang eines Lasers gebracht. Haben Zellen mit den zu untersuchenden Antigenen den Antikörper gebunden, so absorbiert der Fluoreszenzfarbstoff die Energie des Lasers und emittiert ein Licht mit der für den Farbstoff spezifischen Wellenlänge, welches gemessen wird. Gleichzeitig erfährt der Laserstrahl durch Größe und Granularität der Zelle eine charakteristische Streuung, deren Erfassung Informationen über diese Eigenschaften liefert. Zur Messung des Anteils der T-Zellen wurden die Oberflächenantigene CD45 und CD3 mit Hilfe der Farbstoffe Peridinin Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) markiert. Da CD45 auf allen Leukozyten und CD3 nur auf T-Zellen exprimiert wird, konnten somit Leukozyten von Verunreinigungen getrennt und der prozentuale Anteil der T-Zellen bestimmt werden.

Durchführung:

1. Zu 50 µl PBMZ-Suspension einer Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml Medium wurden 10 µl eines Antikörpermischs aus CD3-APC und CD45-PerCP im Verhältnis 3:1 hinzugegeben und gut mit dem Schüttler vermischt.
2. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei 4 °C inkubiert.
3. Danach erfolgte ein Waschgang mit 1 ml FACS-Puffer.
4. Nach einer Zentrifugation bei 200 g für 5 min wurde der Überstand bis auf wenige µl abgesaugt, in denen das Zellpellet mit Hilfe des Schüttlers resuspendiert wurde.
5. Die Messung der Zellen erfolgte kurz darauf mit dem FACSCalibur-Durchflusszytometer, die Auswertung mit CellQuest.
6. Der verbliebene Anteil T-Zellen in CD2-depletierten PBMZ bzw. Splenozyten konnte ebenfalls über die beschriebene Färbung mit CD3-Antikörpern bestimmt werden. Auf der anderen Seite konnte die Reinheit bezüglich der Depletion auch direkt aus der MACS-Negativfraktion kontrolliert werden, da die magnetischen CD2-Antikörper zusätzlich mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluoreszein Isothiocyanat (FITC) markiert waren.

Erfassung transplantationsspezifischer Daten

HLA-Typisierung: HLA-Antigene HLA-A, HLA-B und HLA-DR der Spender und Empfänger wurden mittels Standard-Lymphozytentoxizitätstests und PCR-SSP und/oder PCR-SSO durch das Institut für Transfusionsmedizin der Charité Campus Virchow identifiziert.

Bestimmung panelreaktiver Antikörper: Ein Screening zur Bestimmung von panelreaktiven Antikörpern (PRA) wurde mithilfe eines komplementabhängigen Zytotoxizitätstest bei

Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation routinemäßig alle drei Monate durch das Institut für Transfusionsmedizin der Charité Campus Virchow durchgeführt. Daraus ergaben sich die historisch maximal gemessenen Werte für PRA max. Eine Bestimmung der panelreaktiven Antikörper kurz vor der Transplantation ergab die aktuellen Werte PRA akt.

Diagnose der akuten Rejektion: Eine akute Rejektion des Nierentransplantates wurde durch die histologische Beurteilung eines Transplantatbiopsates nach den Kriterien der Banff-Klassifikation von 1997 durch die Pathologie der Charité gesichert. Eine erfolgreiche, das heißt kreatininsenkende Rejektionstherapie durch einen Kortikosteroidbolus (3*500 mg Methylprednisolon) zu einem Zeitpunkt, zu dem aus klinischen Gründen keine Biopsie möglich war, wurde ebenfalls als Beweis für eine akute Rejektion angesehen.

Bestimmung der Nierenfunktion: Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR in ml/min/1,73m²) wurde für sechs und 12 Monate nach Transplantation nach der MDRD-Formel berechnet [96].

GFR =

$$\frac{(\text{Albumin (g/dl)})^{0,318} * 1,180 (\text{falls schwarze Hautfarbe}) * 0,762 (\text{falls weiblich})}{(170 * \text{Serumkreatinin (mg/dl)})^{0,999} * \text{Alter (Jahre)}^{0,176} * (\text{Serumharnstoff (mg/dl)} * 0,467)^{0,170}}$$

Statistische Analysen

Die Daten wurden statistisch mit Hilfe von SPSS 11.5 für Windows ausgewertet. Da bei den Datensätzen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen und durch die üblichen Tests (Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk) auch meist ausgeschlossen werden konnte, wurden alle statistischen Analysen mit parameterfreien, das heißt rangbasierten Tests durchgeführt. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet, zwischen mehreren Gruppen der Kruska-Wallis-Test. Zusammenhänge zwischen zwei Parametern wurden auf Korrelationen nach Spearman-Rho untersucht.

5 Materialien

Patienten und Probanden

Von den 52 Patienten erhielten 44 Patienten eine Kadaverspende, wovon 32 mit einer immunsuppressiven Therapie bestehend aus anti-IL2R-mAk (Basiliximab), Calcineurininhibitor (Tacrolimus n = 31, Ciclosporin A n = 1), Mycophenolat Mofetil (MMF) und Methylprednisolon (MP), drei mit Tacrolimus, dem Leflunomidanalogon FK778 und MP (wobei nach drei Monaten FK 778 gegen MMF ersetzt wurde) und sieben der Patienten mit FTY720, Ciclosporin A und MP behandelt wurden. Zwei der Patienten, die eine Kadaverspende erhielten, waren durch frühere Transplantationen mit einem rejektionsassoziierten frühen Organverlust sensibilisiert und erhielten eine spezielle Induktionstherapie bestehend aus einer Niedrigdosis OKT3, anti-TNF-mAk (Etanercept) und anti-CD20-mAk (Rituximab) perioperativ sowie fünf Plasmapheresen postoperativ. Danach wurde auf konventionelle Immunsuppression mit Tacrolimus und MP umgestiegen. Acht Patienten erhielten ein Transplantat von einem Lebendspender und wurden mit anti-IL2R-mAk (Basiliximab), Ciclosporin A, MMF und MP behandelt. Ein Patient der Studie war Asiat, alle anderen Kaukasier. Weitere wichtige Charakteristika der untersuchten Patientengruppe sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.

Tabelle 1 Charakteristika der untersuchten Patienten, n = 52

Parameter		Wert
Nierengrunderkrankung:	Chronische Glomerulonephritis	22
	Hämolytisch-urämisches Syndrom	1
	Interstitielle Nephritis	2
	Chronische Pyelonephritis	6
	Polyzystische Niere	15
	Ciclosporintoxizität	1
	Primär maligne Nephrosklerose	1
	Refluxnephropathie	1
	Chronische Niereninsuffizienz o.A.	3
Alter bei Transplantation in Jahren:	Median (Spannweite)	51 (28-69)
Geschlecht:	männlich/weiblich	33/19
Diabetes vor Transplantation:	ja/nein	6/46
Graviditäten (nur Frauen betrachtet):	Median (Spannweite)	1 (0-7)
Patienten mit früheren Tx:	keine/Niere/Leber/Herz	44/6/1/1
Anzahl der Transfusion prä-Tx:	Median (Spannweite)	0 (0-20)
Hämodialysedauer prä-Tx in Monaten:	Median (Spannweite)	80,5 (0-131)
Art des Transplantats:	Lebendspende/Leichenspende	8/44
Spender-/Empfänger-CMV-Serostatus	D+/R+	22
	D+/R-	6
	D-/R+	14
	D-/R-	10
max. PRA prä-Tx:	Median (Spannweite)	0% (0-100 %)
	Patienten mit 0 % max.PRA	33
	Patienten mit > 40 % max.PRA	10
akt. PRA prä-Tx:	Median (Spannweite)	0% (0-80%)
	Patienten mit 0 % akt.PRA	46
	Patienten mit > 40 % akt PRA	1
HLA-Gesamt-Mismatch (A, B, DR):	0/1/2/3/4/5/6	10/6/9/16/8/1/2
Primärfunktion des Organs:	ja/nein/unbekannt	37/14/1
frühe aRx:	ja/nein	18/34
Serumkreatinin nach 6 Monaten in g/dl:	Median (Spannweite)	1,47 (0,67-5,8)
GFR nach 6 Monaten in ml/min/1,73m ² :	Median (Spannweite)	50,6 (13,5-104,3)
Serumkreatinin einem Jahr in g/dl:	Median (Spannweite)	1,43 (0,68-6,97)
GFR nach einem Jahr in ml/min/1,73m ² :	Median (Spannweite)	55,3 (10-109)

Verbrauchsmaterialien und wiederverwendbare Materialien

10 ml Zitratmonovetten	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
14 ml „Cellstar“ Polypropylenröhrchen	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
2070 FALCON-Röhrchen (50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
2052 FALCON-Röhrchen (15 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FALCON-Glaspipetten, steril (2-25 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Sterile Transferpipetten	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen (100 µl, 1000 µl)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen (20 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorfgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (50 ml, 100 ml)	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Filtersysteme (500 ml)	Corning Incorporated, Corning, N.Y.,USA
FALCON-Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FALCON-„Cellstrainer“ (100 µm mesh)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Einmalspritzen, steril (10 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Skalpelle	Becton Dickinson, N.Y.,USA
Objektträger	Menzel-Gläser A1, Essex, England
Prä-Separations Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland.
LD-MACS-Zellseparationssäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
FALCON 96-Well-Mikrotestplatten	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tieffrierröhrchen (1,8 ml)	Nunc Inter Med, Roskilde, Dänemark
96-Well-Multiscreen Mikrotiterplatten <i>Prod. Name MAIPS 4510</i>	Millipore Corporation, Bedford, USA
Pipetten (10-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
12-Kanal-Pipetten (30-300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrchenständer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Feinoptik, Bad Blankenburg, Deutschland
MACS-MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MidiMACS, Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
5100 Cryo 1 °C Freezing Container	Nalge Nunc International, Rochester, USA

Geräte

FACSCalibur-Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge, CR4 22	Jouan, Saint Nazaire, Frankreich H GmbH,
Schüttler, Vortex-Genie2	Scientific Industries, INC, Bohemia, USA
Absaugpumpe Laboport	Neuberger, Freiburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus R Standard	Labinstruments GmbH, Crailsheim, Deutschland
Brutschrank EG 110 R	Jouan, Saint Nazaire, Frankreich
Lichtmikroskop	Olympus, Tokio, Japan

Tiefkühltruhe BT 02 (2722)	COTECH GmbH, Berlin, Deutschland
BIOreader R 3000C	BioSys GmbH, Leverkusen, Deutschland
Wannenbad	Grant Instruments, Cambridge, UK
Laminar-Flow-Box	Kendo, Hanau, Deutschland
Blutbestrahlungsgerät IBL-437C	CIS biointernational, Gif-Sur-Yvette, Frankreich

Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien

phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
---	-----------------------------------

Kulturmedium

1640 RPMI-Medium (500 ml)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
+50 ml Fetales Kälberserum <i>hitzeinaktiviert, 30 min Wasserbad 57 °C</i>	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
+2 mM L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
+100 I.E. Penicillin/ Streptavidin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

→ Nach dem Mischen wurde steril gefiltert.

„Blocking Solution“ PBS-BSA

500 ml phosphatgepuff. Kochsalzlösung	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
+5 g Bovines Serum Albumin	SERVA, Heidelberg, Deutschland

→ Nach dem Mischen wurde steril gefiltert.

„Washing Solution“ PBS-Tween

500 ml phosphatgepuff. Kochsalzlösung	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
+250 µl Tween 20	SERVA, Heidelberg, Deutschland
<i>Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaureat</i>	

PBS-Tween-BSA

500 ml phosphatgepuff. Kochsalzlösung	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
+5 g Bovines Serum Albumin	SERVA, Heidelberg, Deutschland
+250 µl Tween 20	SERVA, Heidelberg, Deutschland
<i>Polyoxyethylene-Sorbitanmonolaureat</i>	

Tieffriermedium

50 ml Fetales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
<i>hitzeinaktiviert, 30 min Wasserbad 57°C</i>	
+10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA, Steinheim, Deutschland

MACS-Puffer

→ Vor der Verwendung musste der MACS-Puffer entgast werden.

500 ml phosphatgepuff. Kochsalzlösung	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
+0,5 % Bovines Serum Albumin	SERVA, Heidelberg, Deutschland
+2 mM EDTA	SIGMA, Steinheim, Deutschland
<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>	

FACS-Puffer

500 ml phosphatgepuff. Kochsalzlösung	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
+0,5 % Bovines Serum Albumin	SERVA, Heidelberg, Deutschland
+0,1 % Natriumazid (NaN ₃)	SERVA, Heidelberg, Deutschland

AEC-Lösung

100 mg AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)	SIGMA, Steinheim, Deutschland
in 10 ml DMF (N,N Dimethylformamid)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

AEC-Puffer

148 ml 0,2 M Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
+352 ml 0,2 M Natrium-Azetatlösung <i>Trihydrate ACS Reagent [613-90-4]</i>	SIGMA, Steinheim, Deutschland
+500 ml Aqua dest.	Braun, Melsungen, Deutschland

→Der pH-Wert wurde auf 5 eingestellt.

weitere Chemikalien

Ficoll-Paque TM PLUS	Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden
Rotipuran [®] 2-Propanol	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland
Biotin	Endogen, Illinois, USA
Streptavidin HRP	Dako, Glostrup, Dänemark
Trypanblau 1 %	Fluka Chemie, Buchs, Deutschland
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

H ₂ O ₂ 30 %	SIGMA, Steinheim, Deutschland
Ethanol 70 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sandimmun ®(Optoral) Lösung 1 ml <i>Ciclosporin</i>	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland
Prograf [®] (tacrolimus injection) 1 ml	Fujisawa GmbH, München, Deutschland

Zellstimulantien und Antikörperkonjugate

Phytohemagglutinin (PHA)	SIGMA, Steinheim, Deutschland
CMV-pp65-Gesamtpeptidmischung Swiss.Prot accession Nr. P0672515-AS- Peptide (11 Überlappungen)	Jerini Biotools, Berlin, Deutschland
IFN γ -Primärantikörper	Endogen, Illinois, USA
IFN γ -Sekundärantikörper	Endogen, Illinois, USA
Anti-CD2 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD3-APC	Becton Dickinson, San Jose, USA
Anti-CD45-PerCP	Becton Dickinson, San Jose, USA

Verwendete Software

SPSS 11.5 für Windows	SPSS Inc., Chicago, USA
MS Office 2003	Microsoft Corp.; Redmont, USA
CellQuest ^{Pro}	Becton Dickinson, San Jose, USA

6 Ergebnisse

In der Theorie stammen die IFN γ -Spots im ELISpot-Assay von spenderspezifischen T-Zellen des Transplantatempfängers, die durch Spenderleukozyten stimuliert wurden. Da jedoch keine weiteren Zytokinmuster oder Oberflächeneigenschaften der sezernierenden Zellen bekannt sind, ist nicht 100 % sicher, dass die Spots tatsächlich von T-Zellen stammen, da theoretisch auch andere Zellen, vorrangig NK-Lymphozyten, IFN γ sezernieren können. Auch die Spezifität der IFN γ -produzierenden Zellen bezüglich des Spenders nicht zu beweisen, da unspezifische Zellen durch die Bildung großer Mengen Zytokine durch benachbarte, spezifische T-Zellen ebenfalls aktiviert werden und IFN γ produzieren könnten (sog. „Byständer“-Effekt). Im Nachfolgenden wird daher statt „spenderspezifische T-Zellen“ nur der Begriff der „spenderreaktiven Zellen“ verwendet. Die Anzahl der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen bezieht sich immer auf $3 \cdot 10^5$ PBMZ, die vom Patienten zum entsprechenden Messzeitpunkt präpariert und im Assay stimuliert wurden. Sie entspricht der Anzahl der Spots/Well. Einen Überblick über die Anzahl und Höhe der ermittelten Werte gibt *Tabelle 2*.

Tabelle 2 Extremwerte und Mediane der zu den verschiedenen Messzeitpunkten ermittelten Werte für spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen aller 52 Patienten der Studie ,Spots/ $3 \cdot 10^5$ PBMZ

Zeitpunkt der Analyse	Median	Minimum	Maximum	n
prä-Tx	6	-70,5	1000	42 / 52
Tag 1 post-Tx	0	-150	246	41 / 52
Woche 1 post-Tx	0	-57	74	29 / 52
Woche 2 post-Tx	4,5	-62,5	154	37 / 52
Woche 3 post-Tx	7	-24	315,5	30 / 52
Woche 4 post-Tx	6,5	-9	253	20 / 52
Woche 5 post-Tx	1,3	-24	240,5	17 / 52
Woche 7 post-Tx	0,5	-5	20,5	19 / 52
Woche 8 post-Tx	38,75	0	65,5	14 / 52
Woche 9 post-Tx	2,25	-6	93,5	6 / 52
Woche 10 post-Tx	1	-4,5	39	9 / 52
Woche 11 post-Tx	31,5	-14	107,5	5 / 52
Woche 12 post-Tx	2,5	-58	19	5 / 52
max. ELISpot-Wert post-Tx	42,5	-0,5	315,5	52 / 52
mittl. ELISpot-Wert post-Tx (min. 3 Werte)	6,4	-9,75	125	41 / 52

Bei 14 Patienten konnten weder vor noch zu irgendeinem Zeitpunkt nach Transplantation spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen im venösen Blut gemessen werden, bei neun Patienten nahm die hohe Anzahl vor Transplantation unter Immunsuppression ab. Bei weiteren neun Patienten stieg die Zahl der messbaren spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen nach Transplantation auf Werte, die höher waren als vor Transplantation, bei 14 Patienten waren die Zellen erstmalig nach Transplantation nachweisbar. Bei 38 der 52 Patienten konnten post-Tx maximal über 10 IFN γ -Spots, bei 25 Patienten über 40 IFN γ -Spots und bei zehn Patienten über 100 IFN γ -Spots gezählt werden.

Zweimal kam es vor, dass sehr viele die Spots zu einer roten Fläche konfluieren, so dass die Kamera diese nicht mehr vollständig diskriminieren konnte. In die Auswertung gingen diese Werte mit durch Messerfahrung geschätzten 1000 Spots ein. Waren die Spots ungleichmäßig nur auf einer Hälfte des Well konfluieren, so wurde der Wert auf 600 geschätzt. Letzteres spielte aber nur für die methodischen Optimierungsversuche eine Rolle und werden in Diagrammen mit einem Pfeil nach oben gekennzeichnet.

Bei der Messung ergaben sich zwei Probleme:

Die Bestrahlung der Spenderleukozyten mit 30 Gray konnte deren IFN γ -Sekretion nicht vollständig unterdrücken. Im Gegenteil, sie schien sogar eine spontane IFN γ -Sekretion der Spenderleukozyten zu begünstigen. Das führte mitunter zu hohen Messwerten für IFN γ -produzierende unstimulierte Spenderleukozyten (Stimulatorzellenleerwerte). Da ein Doppelansatz für solche zufälligen Fehler nicht ausreicht, ergab sich nach Abzug des Leerwerts vom Messwert teilweise eine negative Anzahl IFN γ -produzierender Zellen des Empfängers. Dies konnte jedoch im Laufe der Studie durch die Lagerung der Zellen auf Eis während der Bestrahlung vermindert werden. Obwohl solche negativen Werte biologisch nicht begründbar sind, wurden sie dennoch vollständig in der Auswertung berücksichtigt, da der Fehler zufällig und eine statistische Auswertung trotzdem möglich war.

Die ungenügende Deaktivierung der Spenderleukozyten führte zweitens dazu, dass Patienten, die mit OKT3 behandelt wurden, besonders hohe Werte für IFN γ -produzierende Zellen aufwiesen. OKT3 aktiviert T-Zellen unspezifisch, wodurch sie IFN γ bilden können. Allerdings schienen in diesen Fällen nicht die Patienten-PBMZ selbst IFN γ zu bilden, da eine spontane Bildung von IFN γ in den Leerwerten der Patienten-PBMZ nicht zu beobachten war und auch nicht nach Stimulation der Patienten-PBMZ mit PHA, sondern die Spenderleukozyten. Diese wurden möglicherweise durch unspezifisch an Patientenleukozyten gebundenes OKT3

aktiviert. Die Werte, die zum Zeitpunkt der Verabreichung von OKT3 bzw. einige Tage danach gemessen wurden, konnten somit nicht in die Analyse mit einbezogen werden.

Diese beiden Probleme motivierten zu dem Versuch, neben der Patientenstudie das ELISpot-Assay zu optimieren und die IFN γ -Sekretion der Spenderleukozyten zu unterbinden.

6.1 Einige Patientenbeispiele im Verlauf

Patienten ohne Nachweis spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen

Bei 14 Patienten konnten zu keinem Zeitpunkt weder vor noch nach der Nierentransplantation spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen gemessen werden (zu jedem Messzeitpunkt < 10 IFN γ -Spots). In *Abbildung 4* sind drei dieser Patienten exemplarisch dargestellt. Während der ersten drei Monate nach Transplantation lagen bei diesen Patienten die Serumkreatininwerte im Normbereich unter 1 mg/dl. Bei keinem der drei Patienten konnte eine frühe akute Rejektionsepisode beobachtet werden. Die Nierenfunktion dieser Patienten war ein Jahr post-Tx mit einer GFR von über 69 ml/min/1,73m² und einem Serumkreatininwert von unter 1 mg/dl jeweils sehr gut. Die Patienten hatten eine Kadaverspende erhalten und wurden mit Basiliximab, Tacrolimus und Steroiden immunsuppressiv behandelt.

Patienten mit spenderreaktiven Zellen prä-Tx

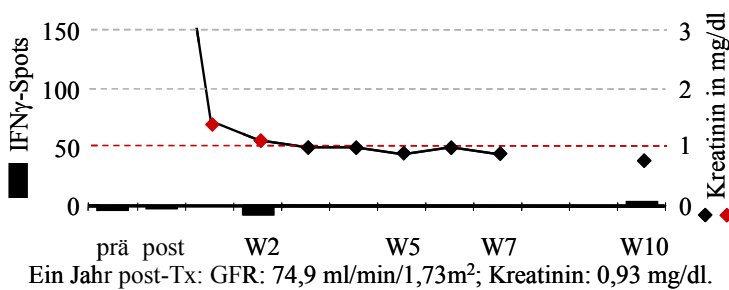
Alle Patienten mit > 200 IFN γ -Spots/3*10⁵ PBMZ vor Transplantation erlitten eine frühe akute Rejektion. Die fünf betroffenen Patienten erhielten eine Kadaverspende und wurden mit Basiliximab, Tacrolimus und Kortikosteroiden immunsuppressiv behandelt - mit Ausnahme von Patient 5, der zunächst mit FTY720, Ciclosporin A und Steroiden therapiert, sechs Wochen nach Transplantation auf Tacrolimus und MMF umgestellt wurde.

In *Abbildung 5* ist der Verlauf der Messwerte für drei der Patienten mit > 200 Spots vor Transplantation dargestellt. Diese drei Patienten erlitten eine schwere akute Rejektionsepisode innerhalb der ersten Woche, die in einem Fall zum Verlust der Organfunktion (Patient 5) und in den anderen Fällen zu einer deutlich eingeschränkten Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation führte (GFR: 33,7 ml/min/1,73m² bzw. 37,5 ml/min/1,73m²). Die beiden letztgenannten Patienten wiesen interessanterweise zu einem Zeitpunkt vor der Transplantation PRA > 40 % auf. Zwei der akuten Rejektionen wurden mit OKT3 behandelt. Die Serumkreatininwerte der Patienten 4 und 5 lagen in den ersten drei Monaten post-Tx

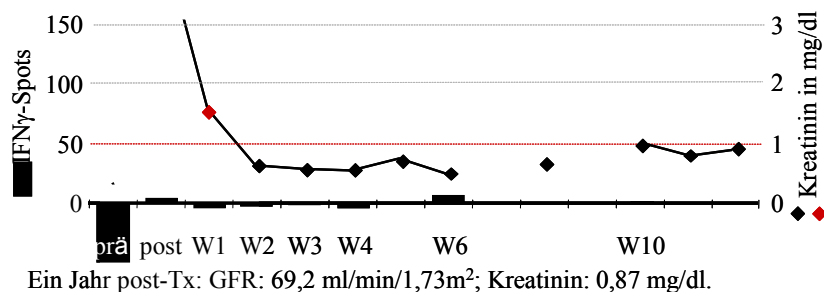
überwiegend weit über dem Normbereich. Bei Patient 6 fiel der Serumkreatininwert vorübergehend in den Normbereich ab.

In *Abbildung 6* kann man die Messwerte der anderen beiden Patienten mit > 200 IFN γ -Spots vor Transplantation verfolgen. Sie erlebten zwar ebenfalls akute Rejektionen (Patient 8 sogar zwei), die jedoch zu einem späteren Zeitpunkt auftraten (Monat 6 bzw. Woche 6 und Monat 4 post-Tx) und mit Kortikosteroiden beherrschbar waren. Das Serumkreatinin lag dabei in den ersten drei Monaten post-Tx über dem Normbereich. Die Nierenfunktion dieser zwei Patienten war nach einem Jahr post-Tx jedoch deutlich besser als die der anderen drei Patienten (GFR: 58 ml/min/1,73m² bzw. 63,5 ml/min/1,73m²).

Patient 1



Patient 2



Patient 3

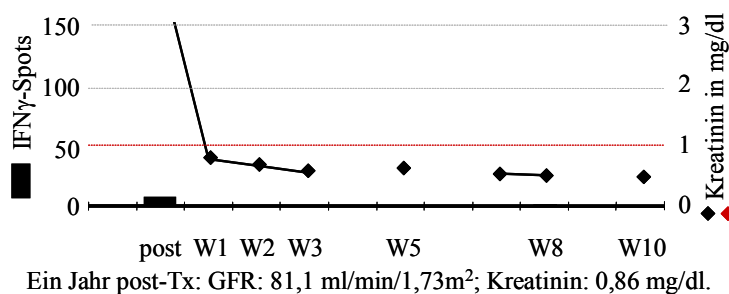


Abbildung 4 Patienten ohne Nachweis spenderreaktiver Zellen vor und nach Nierentransplantation. Die dargestellten Patienten blieben rejektionsfrei und wiesen innerhalb des Messzeitraums Serumkreatininwerte im Normbereich sowie eine gute Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation auf. ELISpot-Messwerte liegen nur zu den beschrifteten Zeitpunkten vor.

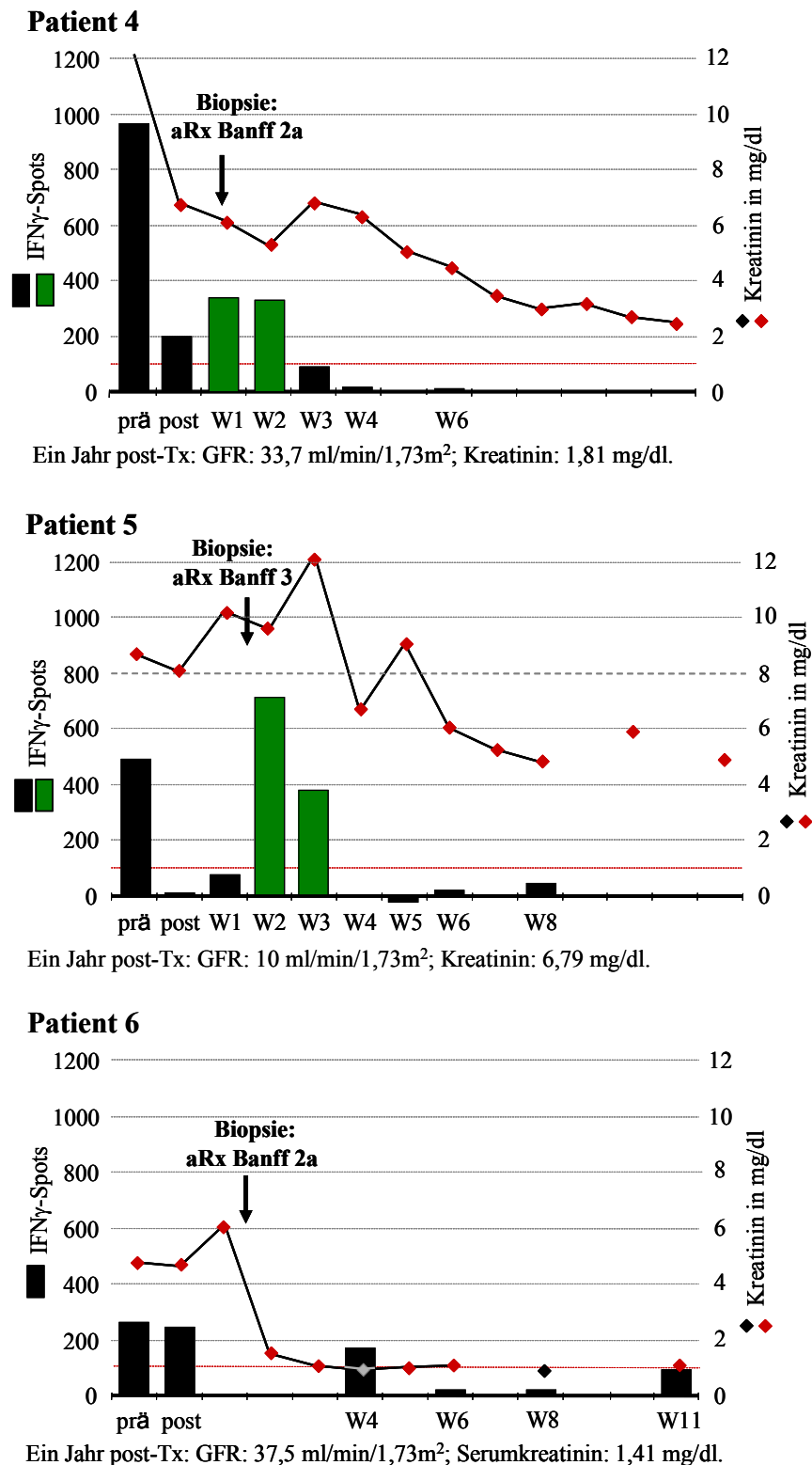
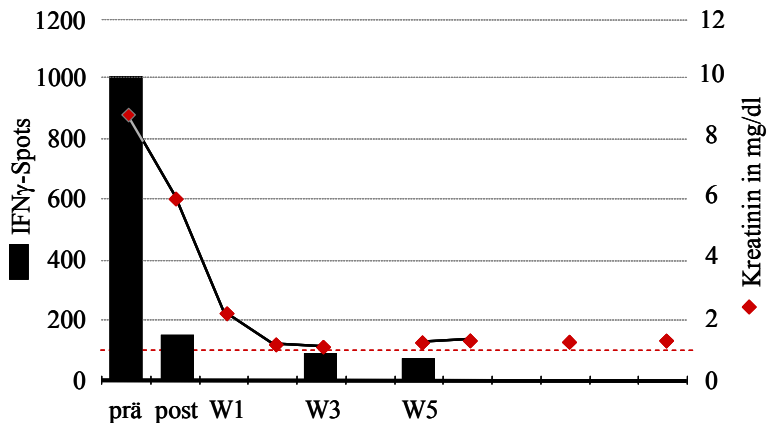
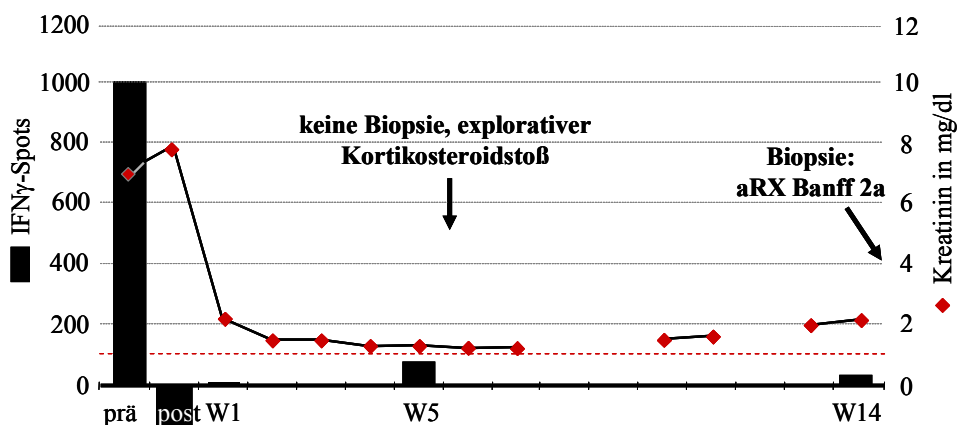


Abbildung 5 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen vor der Nierentransplantation. Die dargestellten Patienten erlitten eine schwere akute Rejektion innerhalb der ersten Woche post-Tx. Während des Messzeitraums lagen die Serumkreatininwerte überwiegend über dem Normbereich. Die Nierenfunktion war ein Jahr nach Transplantation stark eingeschränkt. ELISpot-Messwerte liegen nur zu den beschrifteten Zeitpunkten vor. Unter OKT3-Behandlung sind diese grün abgebildet

Patient 7

Biopsiebefund in Monat 6: Borderline-Rejektion nach Banff.
Ein Jahr post-Tx: GFR: 63,5 ml/min/1,73m²; Kreatinin: 1,4 mg/dl.

Patient 8

Ein Jahr post-Tx: GFR: 58 ml/min/1,73m²; Serumkreatinin: 1,31 mg/dl.

Abbildung 6 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen vor Ttransplantation (2). Die dargestellten Patienten erlitten min. eine akute Rejektion. Bei Patient 8 wurde direkt vor Rejektionsverdacht ein hoher Wert für spenderreaktive Zellen gemessen (70 IFN γ -Spots). Während des Messzeitraums lagen die Serumkreatininwerte über dem Normbereich. Die Nierenfunktion war ein Jahr nach Transplantation jedoch überdurchschnittlich. ELISpot-Messwerte liegen nur zu beschrifteten Zeitpunkten vor.

Patienten mit spenderreaktiven Zellen post-Tx

Bei sieben Patienten, die eine frühe akute Rejektion ihres Organs erlebten, konnte erst nach der Transplantation ein Anstieg der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen beobachtet werden, bei fünf von diesen auf Werte von > 40 IFN γ -Spots. Der Verlauf drei dieser Patienten ist in *Abbildung 7* beispielhaft dargestellt. Diese drei Patienten wiesen während der ersten drei Monate post-Tx überwiegend stark erhöhtes Serumkreatinin auf. Patient 10 und Patient 11 hatten direkt vor einer rejektionsbeweisenden Biopsie einen Anstieg der Anzahl der IFN γ -

Spots. Direkt vor der ersten akuten Rejektion für Patient 11 wurde kein ELISpot-Messwert ermittelt. Bei Patient 9, bei dem zu dem Zeitpunkt, an dem die Zahl der IFN γ -produzierenden Zellen zumindest leicht anstieg, aus klinischen Gründen keine Biopsie möglich war, verbesserte die explorative Gabe hochdosierter Kortikosteroide die Nierenfunktion, was auf eine stattgehabte akute Rejektion hindeutet. Ein Jahr nach Transplantation war die Nierenfunktion der drei Patienten jedoch höchst unterschiedlich zwischen 17,5 ml/min/1,73m² und 58,5 ml/min/1,73m², wobei das Transplantat von Patient 11 zusätzlich einen toxischen Tubulusepithelschaden aufwies. Alle drei Patienten hatten eine Kadaverspende erhalten und wurden mit Basiliximab, Tacrolimus und Steroiden immunsuppressiv behandelt.

Bei 15 Patienten, bei denen zu einem oder mehreren Zeitpunkten nach Transplantation eine hohe Anzahl von IFN γ -produzierenden Zellen (> 40 IFN γ -Spots) gemessen wurde, konnte keine frühe akute Rejektion nachgewiesen werden. In *Abbildung 8* wird der Verlauf der Messwerte von vier dieser Patienten exemplarisch verdeutlicht. Trotz fehlenden Nachweises schädigender Einflüsse wie Toxizität von Immunsuppressiva, Hochdruckschäden, Harnstauung oder Entzündungen des Transplantats waren die Kreatininwerte bei diesen vier Patienten innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation überwiegend über den Normbereich erhöht und die Nierenfunktion war ein Jahr post-Tx mit einer GFR von jeweils unter 44 ml/min/1,73m² bei allen vier Patienten eingeschränkt. Die Patienten hatten eine Kadaverspende erhalten und wurden mit Basiliximab, Tacrolimus und Steroiden immunsuppressiv behandelt.

Patienten, die eine OKT3-Induktionstherapie erhielten

Zwei Patienten erhielten als immunsuppressive Therapie ein spezielles Induktionsschema. Dabei wurde unter anderem OKT3 perioperativ als Bolus (bei Patient 16 auch am Tag 4 nach Transplantation) gegeben. Ziel dieser Therapie ist eine Induktion von AICD (activation induced cell death) der Gedächtniszellen. OKT3 bindet an das CD3-Molekül von T-Zellen und führt zu ihrer Aktivierung und zur Sekretion von IFN γ . Da diese IFN γ -Sekretion alloantigenunabhängig ist, konnten die gemessenen Werte für den Zeitraum der Behandlung mit OKT3 sowie einige Tage danach nicht in die Analyse miteinbezogen werden. Bei beiden Patienten wurde zu einem späteren Zeitpunkt nach Transplantation eine erhöhte Anzahl von IFN γ -produzierenden Zellen nachgewiesen (Patient 16: Woche 8 und Woche 11; Patient 17: Woche 4, Woche 8 und Monat 7 - letzteres nicht dargestellt). Trotzdem sank das Serumkreatinin nach Transplantation dauerhaft auf Normwerte und keiner der beiden Patienten erlitt eine frühe akute Rejektionsepisode. Beide hatten ein Jahr nach Transplantation eine gute Nierenfunktion (GFR: 72,7 ml/min/1,73m² bzw. 109,17 ml/min/1,73m²) [*Abbildung 9*].

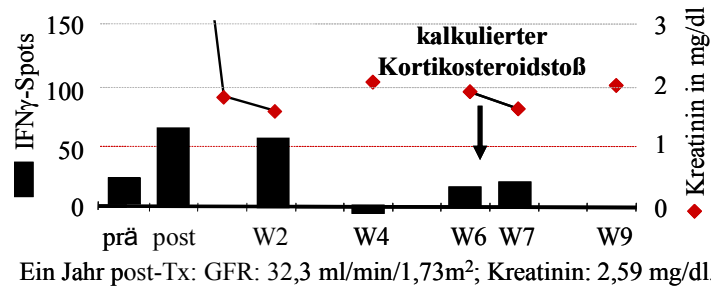
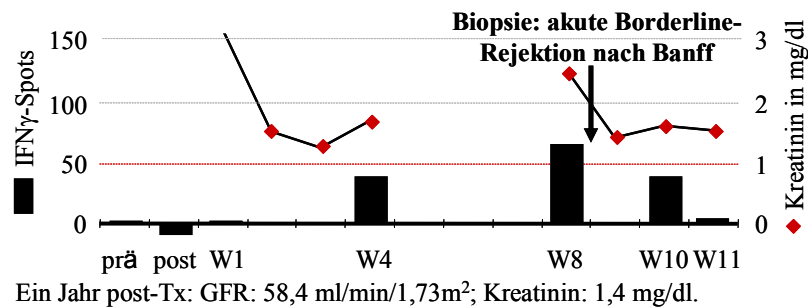
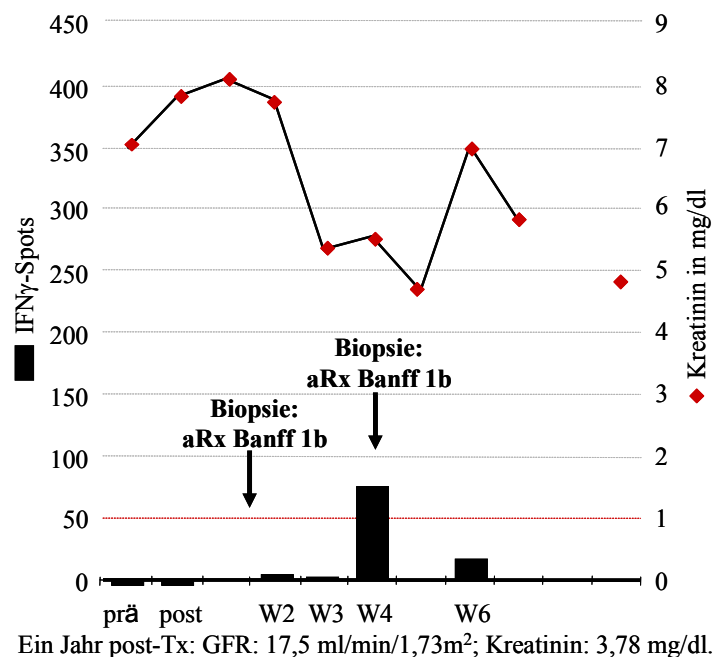
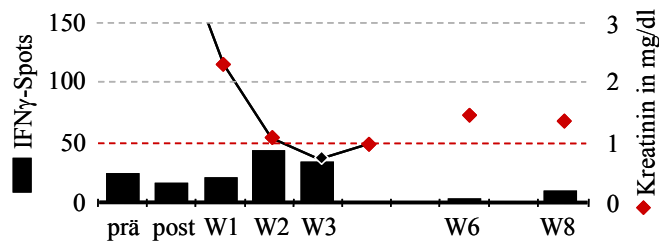
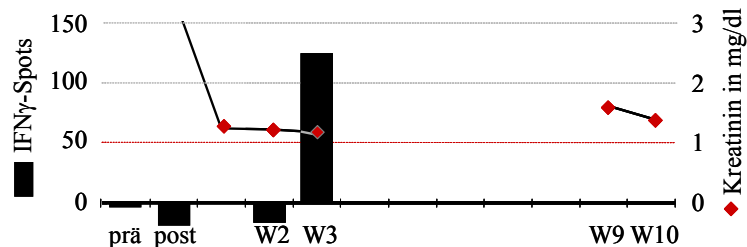
Patient 9**Patient 10****Patient 11**

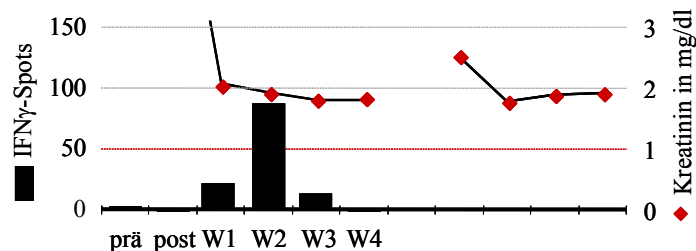
Abbildung 7 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen nach der Nierentransplantation. Die dargestellten Patienten erlitten mindestens eine frühe akute Rejektion. Teilweise konnte direkt nach dem Anstieg der Werte für spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen die Diagnose einer akuten Rejektion gestellt werden. Während des Messzeitraums lagen die Serumkreatininwerte über dem Normbereich. Die Nierenfunktion war ein Jahr nach Transplantation teilweise stark eingeschränkt. ELISpot-Messwerte liegen nur zu den beschrifteten Zeitpunkten vor.

Patient 12

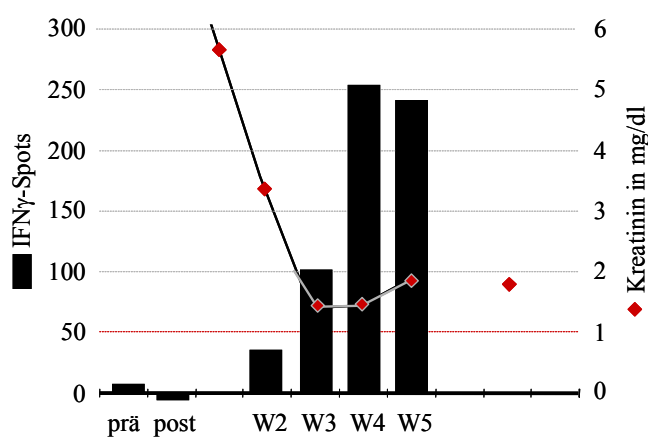
Ein Jahr post-Tx: GFR: 39 ml/min/1,73m²; Kreatinin: 1,39 mg/dl.

Patient 13

Ein Jahr post-Tx: GFR: 34 ml/min/1,73m²; Kreatinin: 1,49 mg/dl.

Patient 14

Ein Jahr post-Tx: GFR: 44 ml/min/1,73m²; Kreatinin: 1,63 mg/dl.

Patient 15

Ein Jahr post-Tx: GFR: 36 ml/min/1,73m²; Kreatinin: 1,56 mg/dl.

Abbildung 8 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen nach Transplantation (2). Bei den dargestellten Patienten wurde keine akute Rejektion diagnostiziert. Trotzdem lagen die Serumkreatininwerte während des Messzeitraums über dem Normbereich und die Nierenfunktion war ein Jahr post-Tx eingeschränkt. ELISpot-Messwerte liegen nur zu den beschrifteten Zeitpunkten vor.

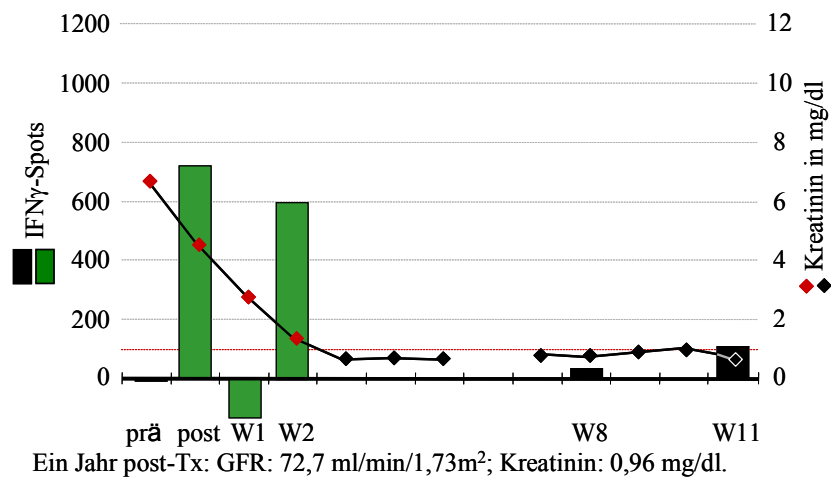
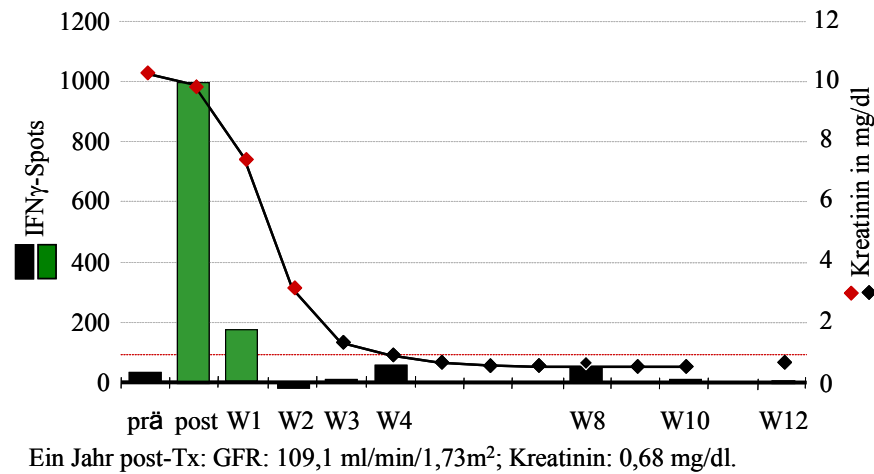
Patient 16**Patient 17**

Abbildung 9 Patienten mit OKT3-Induktionsschema. Obwohl bei den zwei Patienten einige Wochen post-Tx erhöhte Werte für spenderreaktive Zellen gemessen werden konnten, stiegen die Serumkreatininwerte während des Messzeitraums nie über den Normbereich und die Nierenfunktion war ein Jahr post-Tx sehr gut. Unter OKT3-Therapie stiegen die Messwerte fehlerhaft an (grün). ELISpot-Messwerte liegen nur zu den beschrifteten Zeitpunkten vor.

Tabelle 3 Sensibilisierungsfaktoren und Transplantationsverlauf der Patienten mit über 200 IFN γ -produzierenden, spenderreaktiven Zellen/ $3 \cdot 10^5$ PBMZ vor Transplantation.

Pat.-nr.	prä-Tx Wert	aRx	PRA (%) akt/max	früh. Tx	früh. Grav.	früh. Transf.	Dialyse-dauer	HLA-Mismatch	GFR 1 Jahr post-Tx (ml/min/1,73m ²)
4	263	W1	4/63	0	0	2	116 M	2	37,5
5	490	W1	0/0	0	0	0	19,5 M	3	10
6	996	W1	0/44	1	1	2	95 M	0	33,7
7	≥ 1000	M6	0/0	0	0	0	81 M	2	63,5
8	≥ 1000	W6	0/0	1	0	0	36 M	6	58

Zusammenhang mit der Nierenfunktion

Weder innerhalb der Gruppe aller 42 Patienten noch in nach den verschiedenen immunsuppressiven Therapien unterteilten Subgruppen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl IFN γ -produzierender Zellen vor der Transplantation und der Nierenfunktion sechs Monate und ein Jahr nach der Transplantation gezeigt werden.

Zusammenhang mit Sensibilisierungsfaktoren

Patienten, bei denen vor Transplantation nie PRA (max.) nachgewiesen werden konnten, wiesen generell statistisch signifikant weniger spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen vor Transplantation auf als Patienten, bei denen vor Transplantation PRA gemessen werden konnten ($p = 0,026$). Trotzdem konnten auch bei drei der 27 Patienten, bei denen vor Transplantation nie PRA nachgewiesen werden konnten, hohe Zellfrequenzen über 200 Spots und bei zwei weiteren über 100 Spots prä-Tx gemessen werden [Abbildung 11].

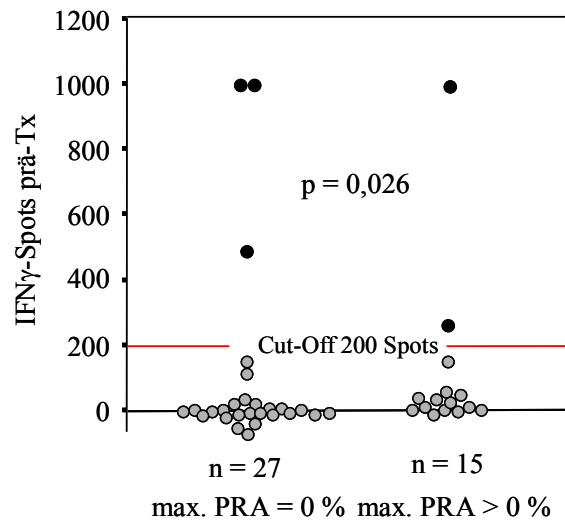


Abbildung 11 IFN γ -produzierende, spenderreaktive Zellen vor Transplantation bei Patienten mit und ohne Nachweis präformierter Anti-HLA-Antikörper (PRA).

Bei vier von fünf Patienten mit über 200 Spots prä-Tx waren direkt vor der Transplantation keine PRA (akt.) messbar und der fünfte Patient wies lediglich ein PRA-Niveau von 4 % auf. Bei dem Patienten mit dem höchsten Wert für PRA direkt vor der Transplantation von über 80 % konnten nur sechs spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen auf $3 \cdot 10^5$ PBMZ mittels ELISpot-Assay gemessen werden.

Weiterhin konnte kein signifikanter statistischer Zusammenhang zwischen spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen vor der Transplantation gemessen im ELISpot-Assay und der Anzahl vorhergehender Schwangerschaften, Bluttransfusionen, vorhergehender Allotransplantationen, der Hämodialysedauer in Monaten und dem HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger (schwankte z.B. bei Patienten mit prä-Tx-Werten von über 200 Spots zwischen 0 und 6) gefunden werden. Auch gab es keine signifikanten Unterschiede der IFN γ -produzierenden Zellen vor Transplantation im Zusammenhang mit der Primärfunktion versus verzögerte Transplantatfunktion und den CMV-Serologien der Spender und Empfänger.

Zusammenhang zwischen spenderreaktiven Zellen prä- und post-Tx

Die Zahl der vor Transplantation gemessenen spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen zeigte eine signifikante Korrelation mit der nach Transplantation gemessenen Anzahl am Tag 1 post-Tx ($r_s = 0,465$; $p = 0,005$; $n = 35$), in Woche 3 ($r_s = 0,467$; $p = 0,019$; $n = 25$) und dem maximalen nach der Transplantation gemessenen Wert ($r_s = 0,542$; $p = 0,000$; $n = 42$). Dabei erreichten drei Patienten mit Werten über 200 Spots vor Transplantation auch die höchsten

Werte am Tag 1 post-Tx, welche gleichzeitig auch die Maximalwerte nach Transplantation darstellten. Unabhängig von diesen drei Patienten korrelierten die Werte vor Transplantation jedoch trotzdem mit dem höchsten gemessenen Wert nach Transplantation ($r_s = 0,454$; $p = 0,004$; $n = 39$).

6.3 Spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen post-Tx

Zusammenhang mit der Nierenfunktion

Bei allen 52 in der Studie eingeschlossenen Patienten konnte zumindest einmal innerhalb von drei Monaten nach Transplantation ein Wert für spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen gemessen werden und daher ein Maximalwert bestimmt werden. Die Mittelwerte aller, jedoch mindestens drei Werte nach Transplantation innerhalb der ersten drei Monate, konnten für 41 Patienten errechnet werden. Zusätzlich wurde analysiert inwieweit bestimmte Zeitpunkte für die Messung von spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen nach Transplantation entscheidend sind. In die Untersuchung gingen somit sowohl die maximalen und mittleren ELISpot-Werte als auch die einzelnen Wochenwerte sowie Mittelwerte zweier aufeinander folgender Wochen ein.

Sowohl in der gesamten Kohorte als auch in den Untergruppen

(a) ohne Patienten, die mit FTY720 oder OKT3-Induktionsschema behandelt wurden ($n = 43$)

(b) nur mit Tacrolimus behandelte Patienten ($n = 35$)

korrelierten der maximale und der mittlere ELISpot-Wert nach Transplantation signifikant negativ mit der GFR nach einem Jahr post-Tx.

Interessanterweise zeigten die durchschnittlichen spenderreaktiven Zellfrequenzen aller untersuchten Patienten der Woche 1 und 2 und der Woche 2 und 3 post-Tx eine signifikant positive Korrelation mit dem Serumkreatinin nach sechs Monaten und einem Jahr post-Tx und eine signifikant negative Korrelation mit der GFR nach sechs Monaten und einem Jahr post-Tx. *Tabelle 4* fasst diese Ergebnisse für die gesamte Patientengruppe zusammen:

Tabelle 4 Korrelationen zwischen der Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen und der Nierenfunktion sechs Monate bzw. ein Jahr post-Tx innerhalb der gesamten untersuchten Patientengruppe, 1: n = 51; 2: n = 48; 3: n = 40; 4: n = 39; 5: n = 41; 6: n = 42

	max. ELISpot-Wert post-Tx	mittl. ELISpot-Wert post-Tx	Mittelwert post-Tx Woche 1 und 2	Mittelwert post-Tx Woche 2 und 3
Serumkreatinin 6 Monate post-Tx	r = 0,163 p = 0,252 ¹	r = 0,248 p = 0,123 ³	r = 0,384 p = 0,012 ⁶	r = 0,325 p = 0,038 ⁵
GFR 6 Monate post-Tx	r = -0,216 p = 0,127 ¹	r = -0,323 p = 0,042 ³	r = -0,310 p = 0,046 ⁶	r = -0,350 p = 0,025 ⁵
Serumkreatinin 1 Jahr post-Tx	r = 0,402 p = 0,005 ²	r = 0,311 p = 0,054 ⁴	r = 0,453 p = 0,004 ⁴	r = 0,349 p = 0,029 ⁴
GFR 1 Jahr post-Tx	r = -0,432 p = 0,002 ²	r = -0,414 p = 0,009 ⁴	r = -0,447 p = 0,004 ⁴	r = -0,390 p = 0,014 ⁴

Ein ähnlicher Zusammenhang fand sich auch allein zwischen den ELISpot-Werten der Woche 2 und der Nierenfunktion nach Transplantation. Er war allerdings nicht so deutlich ausgeprägt und für die GFR nach sechs Monaten auch nicht signifikant (GFR nach einem Jahr post-Tx: $r_s = 0,36$; $p = 0,036$; $n = 34$). Die ELISpot-Werte der Woche 1 korrelierten nur mit der GFR ein Jahr nach Transplantation ($r_s = 0,396$; $p = 0,045$; $n = 26$).

Um die Zusammenhänge grafisch zu verdeutlichen, wurde für die maximalen, die mittleren und die durchschnittlichen ELISpot-Werte der Wochen 2 und 3 ein Cut-Off gewählt, der bei 40, 5 bzw. 10 Spots liegt. Die Gruppen der Patienten, deren Werte für spenderreaktive Zellen über bzw. unterhalb dieses Cut-Offs liegen, unterscheiden sich im Median ihrer GFR ein Jahr nach Transplantation [Abbildung 12]:

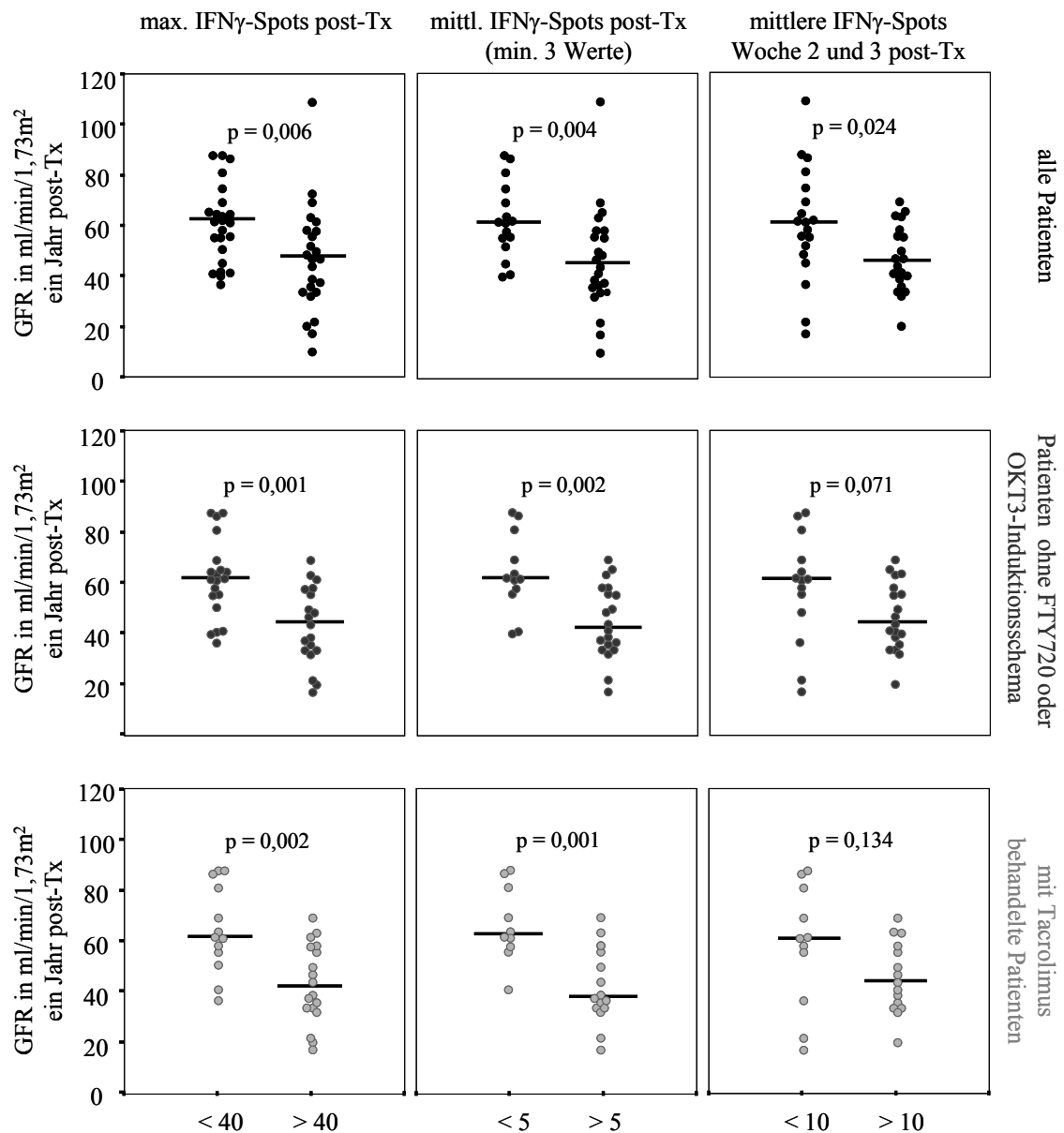


Abbildung 12 Nierenfunktion ein Jahr post-Tx bei Patienten mit Werten spenderreaktiver Zellen post-Tx über bzw. unter einem experimentell ermittelten Cut-Off. Die Gruppen unterscheiden sich in ihrem Median (schwarzer Balken) teilweise signifikant.

Überraschenderweise fielen allerdings drei Patienten auf, die bei hohen maximalen Zellfrequenzen nach Transplantation eine gute Nierenfunktion und keine Rejektionsepisode aufwiesen. Patient 18 der Tacrolimusgruppe erreichte in Woche 3 einen Spitzenwert von über 300 Spots (Serumkreatinin ein Jahr post-Tx: 1 mg/dl; GFR ein Jahr post-Tx: 69,1 ml/min/1,73m²).

Auffallend war, dass dieser Patient in der Zeit vor der Transplantation 20 Bluttransfusionen erhalten hatte. Bei den Patienten 16 und 17, die mit dem OKT3-Induktionsschema behandelt

wurden, waren zu viel späteren Zeitpunkten über 100 Spots (Woche 11) bzw. über 200 Spots (Monat 7) nachweisbar (Serumkreatinin und GFR ein Jahr post-Tx siehe *Abschnitt 6.1*).

Zusammenhang mit frühen akuten Rejektionen

Da akute Rejektionen einen Risikofaktor für die Langzeitfunktion der Transplantatniere darstellen, sollte im folgenden geprüft werden, inwieweit auch subklinische Prozesse erfasst werden.

Auch bei der Analyse der Patientengruppe, in der keine klinisch detektierbaren akuten Rejektionen auftraten, korrelierten der maximale und der mittlere Wert spenderreaktiver Zellen nach Transplantation signifikant negativ mit der GFR nach einem Jahr post-Tx, auch in den Untergruppen **(a)** und **(b)**.

Der Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen in Woche 2 und 3 post-Tx und der Nierenfunktion sechs Monate und ein Jahr post-Tx wurde bei Patienten ohne nachgewiesene Rejektion sogar noch deutlicher. Dies gilt auch für die untersuchten Untergruppen **(a)** und **(b)**.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Korrelationen von spenderreaktiven Zellen und der Nierenfunktion nach Transplantation bei Patienten ohne frühe akute Rejektionsepisode:

Tabelle 5 Korrelationen zwischen der Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen und der Nierenfunktion sechs Monate bzw. ein Jahr post-Tx innerhalb der Patientengruppe ohne frühe akute Rejektionen, 1: n = 33; 2: n = 32; 3: n = 27; 4: n = 26; 5: n = 29; 6: n = 28; 7: n = 30

	max. ELISpot-Wert post-Tx	mittl. ELISpot-Wert post-Tx	Mittelwert post-Tx Woche 1 und 2	Mittelwert post-Tx Woche 2 und 3
Serumkreatinin 6 Monate post-Tx	r = 0,185 ₁ p = 0,303	r = 0,271 ₃ p = 0,171	r = 0,339 ₇ p = 0,067	r = 0,544 ₅ p = 0,002
GFR 6 Monate post-Tx	r = -0,139 ₁ p = 0,441	r = -0,275 ₃ p = 0,164	r = -0,197 ₇ p = 0,297	r = -0,545 ₅ p = 0,002
Serumkreatinin 1 Jahr post-Tx	r = 0,405 ₂ p = 0,021	r = 0,338 ₄ p = 0,091	r = 0,403 ₅ p = 0,030	r = 0,511 ₆ p = 0,005
GFR 1 Jahr post-Tx	r = -0,434 ₂ p = 0,027	r = -0,362 ₄ p = 0,042	r = -0,415 ₅ p = 0,025	r = -0,636 ₄ p = 0,000

