

Verlauf der zellulären Immunantwort bei Lebendnierenempfängern -
Messung von IFN- γ und IL-17 im Elispot-Assay

DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von Conrad Grehn
geboren am 12.12.1983 in Freiburg im Breisgau

angefertigt am Institut für Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer: Professor Dr. Ulrich Sack

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:
06.10.2015

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	I
II	Bibliographische Beschreibung.....	IV
III	Abkürzungsverzeichnis.....	V
1	Einleitung.....	01
1.1	Die T-Zell-vermittelte Immunität.....	01
1.1.1	Die verschiedenen Klassen der T-Lymphozyten.....	01
1.1.2	Interferon-gamma als proinflammatorisches Zytokin.....	04
1.1.3	Interleukin-17.....	04
1.2	Die Nierentransplantation.....	05
1.2.1	Einführung.....	05
1.2.2	Besonderheiten der Lebendnierenspenden.....	06
1.3	Therapeutika bei Lebendnierenspenden.....	07
1.3.1	Calcineurininhibitoren.....	07
1.3.2	Prednisolon.....	08
1.3.3	Mycophenolat-Mofetil.....	09
1.4	Komplikationen bei Transplantationen.....	10
1.4.1	Opportunistische Infektionen.....	10
1.4.2	Kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen.....	11
1.4.3	Maligne Tumore.....	11
1.5	Transplantatrejektion.....	12
1.5.1	Akute Abstoßungsreaktion.....	12
1.5.2	Chronische Transplantatnephropathie.....	13
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	15

2	Materialien und Methoden.....	16
2.1	Studiendesign.....	16
2.2	Materialien.....	17
2.3	Methoden.....	19
2.3.1	Blutentnahmen.....	19
2.3.2	Lymphozytenseparation.....	19
2.3.3	Bestimmung der Zellzahl.....	20
2.3.4	Kryokonservierung der Zellen.....	20
2.3.5	Auftauen von kryokonservierten Zellen.....	20
2.3.6	Bestrahlung von Zellen.....	21
2.3.7	Stimulanzen.....	21
2.3.8	Durchflusszytometrie.....	22
2.3.9	Elispot-Assay.....	23
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Charakteristika der Patienten.....	29
3.2	Medikamentöse Therapieschemata nach Nierentransplantationen.....	32
3.3	Versuche zur Etablierung des Elispot-Verfahrens.....	33
3.3.1	Vorversuche zum Nachweis von IFN- γ	34
3.3.2	Vorversuche zum Nachweis von IL-17.....	36
3.3.3	Versuche mit FKS-freiem Medium.....	37
3.3.4	Vitalitätsmessung in der Durchflusszytometrie.....	38
3.4	Vergleich von Buffy Coats mit Patientenproben im Elispot-Assay.....	38
3.5	Elispot-Assays der Spender-Empfänger-Paare.....	39
3.5.1	Ergebnisse der Elispot-Assays zum Nachweis von IFN- γ	40
3.5.2	Ergebnisse der Elispot-Assays zum Nachweis von IL-17.....	45

3.6	Elispot-Ergebnisse unter Berücksichtigung der HLA-Kompatibilität.....	49
4	Diskussion.....	50
4.1	Bewertung der Methoden.....	51
4.1.1	Patientenauswahl und -akquirierung.....	51
4.1.2	Durchflusszytometrie.....	51
4.1.3	Elispot-Assay.....	52
4.2	Vitalitätsmessung.....	53
4.3	Elispot-Ergebnisse.....	53
4.3.1	Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten Elispot-Assays.....	53
4.3.2	Elispot-Assays der Patienten.....	54
4.3.2.1	IFN- γ -Elispot-Assay.....	54
4.3.2.2	IL-17-Elispot-Assay.....	56
4.3.2.3	IFN- γ -Elispot-Assay und IL-17-Elispot-Assay im Vergleich.....	57
4.4	HLA-Merkmale und Serumkreatininmolarität.....	58
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	59
5	Zusammenfassung.....	62
6	Abstract.....	65
7	Literaturverzeichnis.....	67
8	Tabellenverzeichnis.....	83
9	Abbildungsverzeichnis.....	84
10	Erklärung über die eigenständige Verfassung der Arbeit.....	85
11	Lebenslauf.....	86
12	Danksagung.....	87

II Bibliographische Beschreibung

Conrad Grehn

Verlauf der zellulären Immunantwort bei Lebendnierenempfängern - Messung von IFN- γ und IL-17 im Elispot-Assay

Universität Leipzig, Dissertation

87 S., 148 Lit., 19 Abb., 20 Tab.

Referat:

Um eine drohende Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation zu verhindern, sind die Empfänger auf eine lebenslange Immunsuppression angewiesen. Therapeutisch stehen medikamentöse Schemata im Vordergrund, die für eine breite und meist überschießende Immunsuppression des Empfängers sorgen und die Gefahr möglicher Komplikationen wie z.B. opportunistische Infektionen erhöhen. Dabei gibt es bisher keine valide Möglichkeit, die zelluläre Reaktion auf das Transplantat zu erfassen.

In den Jahren 2009 bis 2012 konnten insgesamt 12 Spender-Empfänger-Paare einer Lebendnierenspende in die Arbeit eingeschlossen werden. Nach Erstellung eines Testverfahrens wurde im IFN- γ - und IL-17-Elispot-Assay der Verlauf der Zytokinproduktion vor bis maximal 90 Tage nach Transplantation gemessen. Dabei wurde jedem Paar zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten Blut entnommen und in den Elispot-Assays untersucht. Die Ergebnisse wurden anschließend mit klinischen Parametern (HLA-Merkmale und Serumkreatininmolarität) der Paare verglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten allerdings keine Abstoßungsreaktionen beobachtet werden, so dass letztlich kein Zusammenhang zwischen den Elispot-Assays und drohenden Abstoßungsreaktionen untersucht werden konnte. Dennoch können mit den etablierten Testverfahren des IFN- γ - und IL-17-Elispot-Assays weitere diagnostische Ansatzpunkte verfolgt werden.

III Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Posphatase
ARE	akute renale Abstoßungsreaktion
BB	Blutbild
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
CD	Klassifikation von Oberflächenproteinen („cluster of differentiation“)
CMV	humanes Cytomegalovirus
CTN	chronische Transplantatnephropathie
d	Tag(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
E	Empfänger
EBV	Eppstein Barr Virus
Elispot	enzyme-linked immunosorbent spot
et al.	und andere (Latein: et alii)
FKS	fötales Käberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Gy	Gray (= 1 Joule/kg)

h	Stunde(n)
HLA	humanes Leukozyten Antigen
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IMPDH	Inosin-5-Monophosphat-Dehydrogenase
IU	international Units
i.v.	intravenös
LW	Leerwert
MLR	Lymphozytenmischreaktion („mixed lymphocyte reaction“)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („Major Histocompatibility Complex“)
mAb	monoklonaler Antikörper
min	Minuten
ml	Milliliter
MLR	Lymphozytenmischreaktion („mixed lymphocyt reaction“)
μ l	Mikroliter
MMF	Mycophenolat Mofetil
n	Anzahl
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsazl
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OKT3	Muromonab-CD3-Antikörper
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen („peripheral blood mononuclear cells“)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphat buffered saline“)

PHA	Phytohämagglutinin
p.o.	per os
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPM	Umdrehungen pro minute („Rounds per minute“)
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
S	Spender
s	Sekunden
SD	Standardabweichung („standard deviation“)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transformierender Wachstumsfaktor („transforming growth factor“)
TNF	Tumor Nekrosefaktor
TNTC	too numerous to count
T _C -Zellen	zytotoxische T-Zellen
T _H -Zellen	T-Helferzellen
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
Tx	Transplantation
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

1 Einleitung

Das Immunsystem des Empfängers spielt bei der Übertragung von soliden Organen eine zentrale Rolle, da es über Annahme oder Abstoßung eines transplantierten Organs entscheidet. Dabei stellt eine (hyper-) akute Abstoßungsreaktion auch für das Überleben des Empfängers eine große Gefahr dar. Bereits seit der ersten allogenen Transplantation im Jahre 1950 wird versucht, die Immunreaktion des Empfängerorganismus so gering als möglich zu halten. Seither wird über eine Reihe unterschiedlicher Ansatzpunkte (Operationsverfahren, immunologische Modifikationen, genetische Untersuchungen, etc.) versucht, die Erfolgsaussichten einer Transplantation zu vergrößern. Das Verstehen des Immunsystems ist daher unerlässlich für die Durchführung einer Transplantation.

1.1 T-Zell-vermittelte Immunität

Der folgende Abschnitt ist auf die Darstellung der T-Zellen beschränkt, da besonders ihre Funktion in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte. Im Kontext der T-Zell vermittelten Abstoßungsreaktion sollten die Zytokine IFN- γ und IL-17 beleuchtet und auf ihre Funktion als proinflammatorische Marker eingegangen werden.

1.1.1 Die verschiedenen Klassen der T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten sind Teil des erworbenen Immunsystems. Durch die Bildung von Gedächtniszellen ermöglichen sie dem Körper eine immunologische Erinnerung. Sobald ein fremdartiges Peptid dem naiven T-Lymphozyten präsentiert wird, differenziert dieser zu einer T-Effektorzelle. Dadurch löst die T-Effektorzelle eine Reihe von zusätzlichen Immunreaktionen aus. Bei erneutem Kontakt mit dem gleichen fremdartigen Peptid sorgen die T-Gedächtniszellen folglich für eine schnelle und effektivere Immunantwort des Körpers.

Die Reifung der T-Lymphozyten erfolgt im Thymus. Anhand der Präsentation von körpereigenen Antigenen werden durch die positive und negative Selektion bis zu 98% der dort vorhandenen autoreaktiven Thymozyten aussortiert und apoptotisch abgetötet. Durch den Mechanismus einer genetischen Rekombination von Gensegmenten wird eine Variabilität des T-Zell-Rezeptors von 10^{11} bis 10^{12} Varianten erreicht. Dadurch wird

garantiert, dass eine nahezu unendliche Anzahl von Antigenen durch T-Zellen erkannt wird. Nach der Reifung gelangen die naiven T-Zellen sowohl in das Blut- als auch in das Lymphsystem, bis sie aktiviert werden und weiter differenzieren (1).

Die T-Zellen werden in zwei Klassen eingeteilt, die CD4 positiven T-Helferzellen (T_H -Zellen), und die CD8 positiven zytotoxische T-Zellen (T_c -Zellen). Physiologisch beträgt das Verhältnis zwischen T_H -Zellen und T_c -Zellen im Blutkreislauf circa 2:1.

T_H -Zellen erkennen mit Hilfe ihrer CD4- und T-Zell-Rezeptoren Antigene, die zusammen mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex-II (MHC-II) an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen/Monozyten, Dendritische Zellen, B-Lymphozyten) exprimiert werden. Die MHC-II-Moleküle präsentieren fremde Peptide, welche die antigenpräsentierenden Zellen selbst endo- bzw. phagozytiert haben. Dabei vermitteln T_H -Zellen die Makrophagenaktivierung sowie die klonale Expansion und Ausreifung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen.

Die T_c -Zellen dagegen erkennen Antigene durch Präsentation auf MHC-I-Molekülen, die sich auf der Oberfläche fast aller Körperzellen befinden. Diese Antigene stammen aus dem Cytosol der jeweiligen Zelle und stellen in vielen Fällen Autopeptide dar. Sobald die T_c -Zellen ein fremdes oder fehlerhaftes Peptid auf einem MHC-I-Komplex erkennen, wird durch Aktivierung von Perforinen und Granzymen der apoptotischen Untergang der Zielzelle eingeleitet (2).

Mosmann und Coffmann beschrieben erstmals 1987 zwei unterschiedliche Subklassen der T_H -Zellen, die T_{H1} - und T_{H2} -Zellen (3,4). Dabei bestimmt zunächst das umliegende Zytokinmilieu die Art der Differenzierung. Während sich die T_{H1} -Zellen nur in einem Zytokinmilieu von IFN- γ und IL-12 entwickeln, wird IL-4 für die Differenzierung der T_{H2} -Zelle benötigt (5). T_{H1} -Zellen sind vor allem durch die Sekretion der Zytokine Interferon-gamma (IFN- γ), Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-2 (IL-2) charakterisiert (6). Sie sind für die Abwehrreaktion gegenüber viralen Keimen und myeloiden Zellen mit intrazellulären Bakterien verantwortlich (7). Zudem können T_{H1} -Zellen durch kostimulierende Signale B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen (2). T_{H2} -Zellen stimulieren durch die Freisetzung zahlreicher Zytokine wie Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 10 (IL-10) die Reifung sowie das Wachstum von B-Zellen. Zudem erfolgt durch die aus T_{H2} -Zellen freigesetzten Zytokine eine Reifung der eosinophilen Granulozyten und eine Inhibition der Makrophagen (6).

Lange Zeit galt das T_{H1}/T_{H2} -Paradigma als relativ einfache Gegenspieler-Theorie. Diese Sichtweise wurde 1993 von Rouvier und Mitarbeitern durch die Entdeckung der CD4+-

T_{H17} -Zellen widerlegt, die heutzutage zu den T-Effektorzellen gezählt werden (8). Die T_{H17} -Zellen sind durch die Produktion von Interleukin-17 (IL-17) ohne zusätzliche Freisetzung von IL-4 oder IFN- γ charakterisiert. Für die Differenzierung einer naiven $CD4^+$ -T-Zelle zu einer T_{H17} -Zelle ist das Vorhandensein von TGF- β in ihrer Umgebung obligatorisch. Interleukin-23 (IL-23) dagegen ist nicht für die Differenzierung, jedoch für das Überleben einer T_{H17} -Zelle notwendig (7,9–11). Die T_{H17} -Zellen unterliegen der Kontrolle des Transkriptionsfaktors RAR-related orphan receptor gamma-t (ROR γ t) und exprimieren vor allem die Zytokine IL-6, IL-17, IL-22. Neben der Bekämpfung von extrazellulären Bakterien und Pilzen spielen sie offensichtlich eine große Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Multipler Sklerose (MS), Rheumatoider Arthritis (RA), Asthma bronchiale und Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) (12–17).

Eine weitere Gruppe der $CD4^+$ -Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen). Sie regulieren eine Reihe von Immunantworten und verhindern eine überschießende Reaktion des Körpers. Sie sind vor allem durch die Produktion der beiden Zytokine IL-10 und TGF- β charakterisiert. Als immunregulatorische Zellen sind sie in der Lage, die Aktivierung,

Darstellung der Entwicklung verschiedener T-Zellen

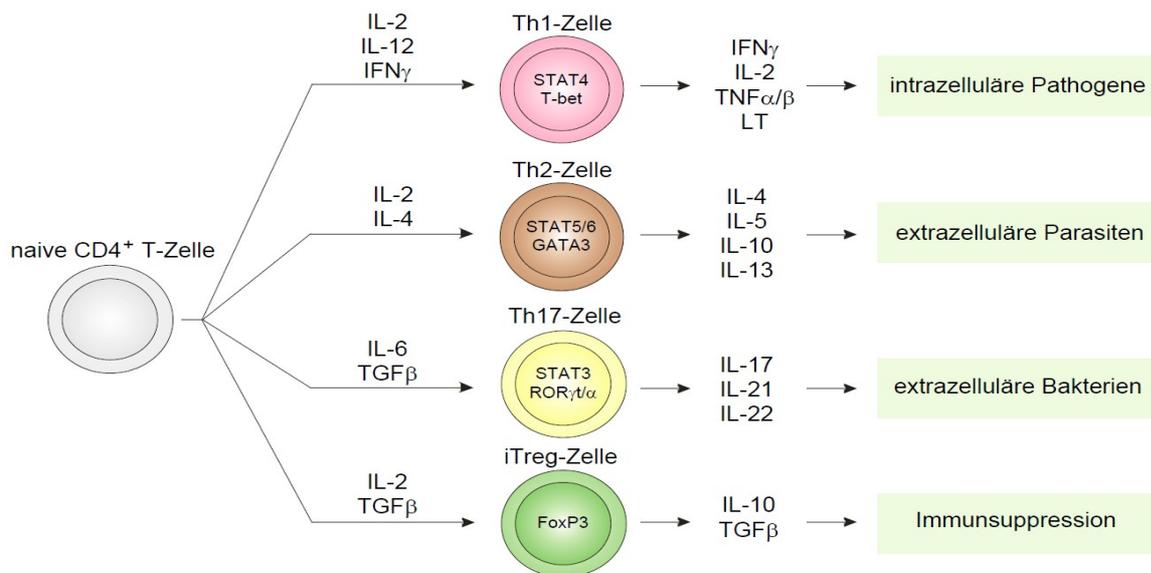


Abb. 1.1: Darstellung der Entwicklung von T_{H1} -, T_{H2} -, T_{reg} - und T_{H17} -Zellen sowie deren Leitzytokine und spezifischen Funktionen; aus (18)

Proliferation und Funktion von B-Zellen, dendritischen Zellen und anderen T-Zellen zu unterbinden (19). Es konnte gezeigt werden, dass T_{reg}-Zellen eine Suppression der Bildung von T_{H17}-Zellen und der korrespondierenden proinflammatorischen Antwort bewirken (7). Zusätzlich werden den T_{reg}-Zellen wichtige Funktionen bei der Annahme von transplantierten Organen zugeschrieben (20,21). Einen Überblick der Differenzierung verschiedener CD4⁺-T-Zellen bietet Abb. 1.1.

1.1.2 Interferon-gamma als proinflammatorisches Zytokin

Interferon-gamma (IFN- γ) ist der einzige Vertreter der Interferon-II-Klasse, welcher sich sowohl funktional als auch strukturell von der Interferon-I-Klasse unterscheidet. Als stark proinflammatorisches Zytokin ist es verantwortlich für die T_{H1}-Antwort des Körpers. Seine Hauptfunktion besteht in der Aktivierung der Makrophagen. So steigert es die Expression der MHC-Proteine auf der Oberfläche von Makrophagen und zahlreichen anderen Zelltypen und begünstigt durch eine Herabregulierung der T_{H2}-Antwort zusätzlich die proinflammatorischen Entzündungsreaktion (1,22).

Hauptproduzent von IFN- γ ist am Anfang jeder Infektion die natürliche Killerzelle. Durch die Bindung von IFN- γ an den IFN- γ -Rezeptor der naiven T-Zelle differenziert diese mit Hilfe des Transkriptionsfaktors T-bet zu einer T_c-Effektorzelle. Sobald die T_c-Zelle aktiviert wurde und den Infektionsort aufgesucht hat, wird sie wiederum zum Hauptproduzenten von IFN- γ (1).

Zahlreiche Studien liefern Hinweise darauf, dass IFN- γ bei Abstoßungsreaktionen eine entscheidende Rolle spielt und die Intensität seiner Ausschüttung Rückschlüsse auf eine Abstoßungsreaktion zulässt (21,23,24).

1.1.3 Interleukin-17

Interleukin-17 (IL-17) repräsentiert eine Zytokinfamilie mit sechs Mitgliedern (IL-17A-F). Es wird von T_{H17}-Zellen produziert, jedoch auch in geringen Mengen von NK-Zellen, den $\gamma\delta$ -T-Zellen, den lymphoid-tissue-inducer (Lti) Zellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (7,25,26). Somit beteiligt sich IL-17 an Immunreaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems.

Rezeptoren für IL-17 finden sich nahezu ubiquitär auf hämatopoetischen Stammzellen, Osteoblasten, Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen (25). Dabei generiert das am

häufigsten untersuchte Mitglied, IL-17A, in der Frühphase der Infektion eine proinflammatorische Antwort. Dieser Effekt wurde auch für Transplantatabstoßungsreaktionen beschrieben (27). In der Zielzelle führt die Bindung von IL-17 zur Expression zahlreicher Zytokine (TNF, GM-CSF, G-CSF), Chemokine (CXCL1, CXCL8, CXCL10) und Metalloproteasen. Interleukin-17 ist zudem als Leitzytokin für die Rekrutierung, Aktivierung und Migration neutrophiler Granulozyten bekannt (25).

1.2 Die Nierentransplantation

In Abschnitt 1.2 werden geschichtliche und statistische Daten der Nierentransplantation dargestellt. Aspekte der Lebendnierenspende werden besonders hervorgehoben.

1.2.1 Einführung

Die erste chirurgisch erfolgreiche Nierentransplantation wurde 1950 bei Ruth Tucker in Evergreen Park, Illinois, USA, durchgeführt, wobei die Patientin aufgrund fehlender immunsuppressiver Therapiemöglichkeiten zehn Monate später verstarb (28). 1954 gelang Joseph Murray in Boston die erste nachhaltig erfolgreiche Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingen (29).

Die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie wurde bereits in den 1950er Jahren erkannt, jedoch befand man das Kortison, welches in einer zehnfach schwächeren Konzentration als heutzutage üblich verabreicht wurde, zunächst als unbrauchbar (29). Erst Ende der 1950er bzw. Anfang der 1960er Jahre wurde durch die Entdeckung von 6-Mercaptopurin und Azathioprin sowie einer Therapie mit höheren Kortisonkonzentrationen eine adäquate Immunsuppression ermöglicht (29,30,31).

2011 wurden in Deutschland 2850 Nieren transplantiert. Dabei entfielen ca. 28% auf Lebendspenden. Während die Zahl an sogenannten Kadaverspenden in den USA und Deutschland nahezu stagniert, steigt die Zahl an Lebendnierenspenden kontinuierlich an (32,33). Dennoch warteten 2012 allein in Deutschland knapp 8000 Menschen auf eine Spenderniere (34).

Derzeit ist eine Organspende post mortem entweder durch Zustimmung der Angehörigen oder aufgrund der schriftlich niedergelegten Bereitschaftserklärung des Verstorbenen möglich. Um die Zahl von Nierenspenden zu steigern, beschloss der Bundestag 2012 ein

Gesetz, wonach Menschen mit einer deutschen Krankenversicherung einmal in ihrem Leben aufgefordert werden sollen, im Hinblick auf die Verwendung der Organe nach ihrem Tod Stellung zu nehmen (34). Die überraschende und zeitlich begrenzte Entscheidungspflicht Verwandter im Falle des Hirntodes eines Angehörigen, die damit einhergehenden Unsicherheit über den vermeintlichen Willens des Verstorbenen sowie der organisatorische und finanzielle Aufwand einer Organentnahme in einem Klinikum stehen einer höheren Anzahl an gespendeten Organen seit Jahren im Weg.

Nach einer Nierentransplantation ist es wichtig, das Funktionieren der transplantierten Niere untersuchen zu können. Als Verlaufsparemeter der Nierenfunktion wird dabei häufig die Serumkreatininmolarität bestimmt. Obwohl diese von der Muskelmasse des Individuums abhängt, stellt sie in Relation zum Ausgangswert einen geeigneten Paremeter dar, um die Ausscheidungsfähigkeit der Niere und damit die Qualität der Nierenfunktion zu beurteilen (35).

1.2.2 Besonderheiten bei Lebendnierenspenden

Die Lebendnierenspende bezeichnet die Transplantation der Niere von einem lebenden Spender. Dabei ergeben sich durch die ausgiebige Planbarkeit dieses Eingriffs zahlreiche Unterschiede zu einer Kadavertransplantation. Statistisch gesehen hat eine von einer lebenden Person gespendete Niere mit 85,6% eine signifikant höhere 5-Jahres-Überlebensrate als eine Kadaverspende mit 71,1% (33). Dies liegt neben der geringeren Dialysezeit des prospektiven Empfängers und der damit einhergehenden geringeren Komorbidität vor allem an der verkürzten Ischämiezeit des transplantierten Organs.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion weiter beurteilen oder durch eine erhöhte Immunsuppression verringern zu können, wird zusätzlich eine HLA-Typisierung durchgeführt, da gebildete HLA-Antikörper im Blut der Empfänger die Überlebenszeit einer transplantierten Niere akut oder chronisch verkürzen (39,40). Eine Studie von Ishikawa und Mitarbeitern zeigt unter 112 Lebendnierenspenden eine erhöhte Anzahl von akuten Rejektionsepisoden von 31,8% bei genetisch nicht verwandten Paaren im Vergleich zu genetisch verwandten Paaren (24,2%) (HLA-A/-B Mismatch: 2,73 vs. 1,44) (38). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ein Mismatch bei den sogenannten Minor Histokompatibilitäts-Antigenen (mHags) zu keiner geringeren Annahmewahrscheinlichkeit nach Nierentransplantation führt (41,42).

Mittlerweile gibt es Überlegungen, durch Stammzelltransplantationen die Annahme-

wahrscheinlichkeit einer Niere zu erhöhen (43). Auch gibt es die Möglichkeit einer ABO-Blutgruppen-inkompatiblen Spende (44), die aufgrund der notwendigen Empfängerkonditionierung mit festgelegtem Zeitfenster auf Lebendnierenspenden beschränkt ist.

Juristisch müssen Empfänger einer Lebendniere entweder mit den Spendern verwandt sein oder im Falle einer nicht existierenden Verwandtschaft eine besondere persönliche bzw. emotionale Verbundenheit zu diesen aufweisen. Auch darf die Transplantation erst mit Einwilligung des Spenders nach dessen Aufklärung erfolgen, und zwar nur, wenn keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen drohen, die über das Operationsrisiko hinaus gehen (Transplantationsgesetz §8).

Wichtig für den Erfolg einer Transplantation ist zudem die psychosoziale Komponente. Dabei zeigt sich bei den Spendern eine erhöhte psychische Symptombelastung. Depressivität, Ängstlichkeit und Aggressivität sind bei den Spendern postoperativ verstärkt. Empfänger sind nach Transplantation mit ihrem Leben zufriedener als vor der Transplantation. Erwartungsgemäß geben die Empfänger postoperativ keine Verschlechterung der Lebensqualität an (45-47).

1.3 Therapeutika bei Lebendnierenspenden

Grundvoraussetzung für die Annahme einer transplantierten Niere ist eine ausreichende Immunsuppression (eineiige Zwillinge ausgenommen). Dabei wird eine lebenslang notwendige Immuntherapie vorausgesetzt. In der Regel wird die Therapie vor Transplantation mit einer Initialdosis aus Tacrolimus begonnen und nach Transplantation mit einer Dreifach-Kombination aus Tacrolimus, Prednisolon und Mycophenolat-Mofetil fortgeführt.

In den folgenden Abschnitten werden die Wirkungsmechanismen der drei Immunsuppressiva genauer erörtert.

1.3.1 Calcineurininhibitoren

Calcineurininhibitoren (CNI) stellen seit der Entdeckung von Cyclosporin A im Jahre 1983 die Eckpfeiler der immunsuppressiven Therapie bei Transplantationen dar. Heutzutage wird das Makrolid Tacrolimus dem Cyclosporin A bei Nierentransplantationen mit einer besseren Verträglichkeit aufgrund einer niedrigeren Dosierung bei gleicher Wirksamkeit

vorgezogen (48,49).

Physiologisch wird durch die Bindung eines Antigens an den TCR-Komplex und den damit verbundenen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Diese dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NF-AT, der daraufhin in den Zellkern wandert und dort durch die Bindung an die jeweilige Promotorregion die Transkription verschiedener Lymphokine induziert. Dabei spielt die Hemmung des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 die wichtigste Rolle der durch Calcineurin vermittelten Immunantwort. Neben IL-2 wird durch die von Calcineurin ausgelöste Signalkaskade vor allem der Fas-Ligand und der CD40-Ligand produziert (2).

Sowohl Tacrolimus als auch Cyclosporin A hemmen die Aktivierung von Calcineurin im Zytoplasma mithilfe von Immophilinen und verhindern somit die Bildung proinflammatorischer Zytokine und die Expression ihrer Rezeptoren (49).

Als Nebenwirkung von Calcineurininhibitoren ist deren Nephrotoxizität von erheblicher negativer Bedeutung. Hierbei kommt es durch die Hyalinisierung der Nierenarteriolen, der tubulären Atrophie und der Fibrosierung der Bowman Kapsel zu einem verringerten Plasmafluss und mit fortschreitendem Therapieverlauf zu einer Schädigung des gesamten Nierenparenchyms (50,51).

1.3.2 Prednisolon

Das Glucocorticoid Prednisolon stellt den zweiten wichtigen Baustein immunsuppressiver Standardtherapie nach Nierentransplantationen dar.

Es entfaltet seine Wirkung über verschiedene „Angriffspunkte“. Dabei kann es die Zusammensetzung der Lipidmembran verändern, was sich bei Immunzellen an einem verringerten Kalzium- und Natriumkreislauf an der Zellmembran zeigt. Zudem aktiviert es zahlreiche Proteinenzyme innerhalb der Zelle wie die Proteinkinase C (52). Mit Hilfe des Glucocorticoid Rezeptors (GCR) manipuliert Prednisolon die Gentranskription, wobei es die Transkription von immunsuppressiven Proteinen bzw. Faktoren (IL-10, Anxin A1, I κ B) fördert und gleichzeitig die Bildung proinflammatorischer Proteine (IFN- γ , TNF, IL-1, IL-2, IL-6, COX-2) hemmt (53). Prednisolon reguliert bis zu 20% aller in einem Leukozyten befindlichen Gene. Vorwiegend induziert Prednisolon durch die Bildung von Endonukleasen die Apoptose von Lymphozyten und eosinophilen Leukozyten (2).

Da die Steroidhormonrezeptoren ubiquitär vorhanden sind, besteht bei langwieriger Prednisolontherapie eine erhebliche Gefahr für zahlreiche gravierende Nebenwirkungen

wie z.B. Diabetes, Gewichtszunahme, Arteriosklerose, Hyperlipidämie und Osteoporose. Bereits bei niedrig dosierter Prednisolontherapie wurde ein erhöhtes Frakturrisiko nachgewiesen (54). Die Mortalität bei anhaltender Prednisolontherapie bei Nierenempfängern ist zudem erhöht (55).

Bereits seit Jahrzehnten wird aufgrund dieses Spektrums von Nebenwirkungen immer wieder nach Möglichkeiten einer prednisolonfreien Immunsuppression bei Nierentransplantierten gesucht, wobei erst seit der Einführung von Mycophenolat-Mofetil eine deutliche Reduktion der Prednisolontherapie möglich scheint (51).

1.3.3 Mycophenolat-Mofetil

Mycophenolat-Mofetil (MMF) ist ein Pro-Pharmakon der im Körper aktiven Mycophenolsäure.

Mycophenolsäure hemmt die Inosin-5-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH). Diese ermöglicht physiologisch die de-novo Synthese von Guanosinnukleotiden. Da Mycophenolat die Typ-II Isoform der IMPDH, welche bevorzugt in T- und B-Lymphozyten vorkommt, fünfmal stärker inhibiert als die in den „regulären“ Zellen (z.B. Fibroblasten) vorkommende Typ-I Isoform, schafft es dadurch eine Selektivität in der Proliferationshemmung dieser Immunzellen (49). Weiterhin verhindert Mycophenolsäure die Adhäsion der T-Lymphozyten an der Gefäßwand durch Synthesehemmung spezieller Adhäsionsmoleküle und inhibiert die Stickstoffmonoxid- (NO-) Produktion durch Hemmung einer spezifischen NO-Synthase (iNOS). Als Folge verringert sich die Produktion von gewebeschädigenden Peroxynitrite durch Makrophagen und Monozyten (56).

Seit seiner Zulassung in den USA im Jahre 1995 wird MMF zur immunsuppressiven Therapie bei Organspenden verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von MMF zusätzlich zu der vorher angewandten Kombination aus Tacrolimus und Prednisolon eine niedrigere Inzidenz an Abstoßungen zur Folge hat und zusätzlich eine niedrigere Prednisolondosierung ermöglicht (51,57,58). Darüber hinaus fördert es durch die vermehrte Bildung von T_{reg}-Zellen nach Transplantation eine Toleranzentwicklung bei Organtransplantationen (59).

Als typische Nebenwirkungen von MMF gelten gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Diarrhö) sowie Blutbildveränderungen (Anämie, Leukopenie). Opportunistische Infektionen sind wie bei allen Immunsuppressiva ebenfalls erhöht.

1.4 Komplikationen bei Transplantationen

Die Vermeidung möglicher Abstoßungsreaktionen bedingt eine lebenslange Immunsuppression (siehe 1.3). Dadurch wird der Organismus anfälliger für mögliche Komplikationen. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang opportunistische Infektionen, kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen, sowie eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von Tumorerkrankungen.

1.4.1 opportunistische Infektionen

Infektionen stellen bei Nierentransplantationen die häufigste Komplikation sowie die zweithäufigste Todesursache dar (60). Aufgrund der verbesserten Operationstechnik sowie potenteren Immunsuppressiva und Antiinfektiva liegt die 1-Jahres-Mortalität für Nierentransplantierte bei unter 5% (61). Abb. 1.2 zeigt einen Überblick der häufigsten Keime im Zeitverlauf. Die häufig auftretenden Infektionen werden drei unterschiedlichen Perioden zugeordnet. Multiresistente Keime stellen im ersten Monat nach Transplantation die häufigsten Infektionsquellen dar. Ausgangspunkte sind vor

allem Wundinfektionen und katheterassoziierte Harnwegsinfektionen. Während der intermediären Posttransplantationsperiode (1.-6. Monat) sind es opportunistische Infektionen, hervorgerufen durch das Epstein Barr Virus (EBV), das Cytomegalievirus (CMV) sowie das BK-Polyomavirus. Vor allem die Reaktivierung eines oder die Neuinfektion mit einem Cytomegalievirus ist von Bedeutung und wird daher bei Spendern und Empfängern sowohl prä- als auch postoperativ genauestens beobachtet. In der

Zeitliche Einordnung der Erreger nach Transplantation

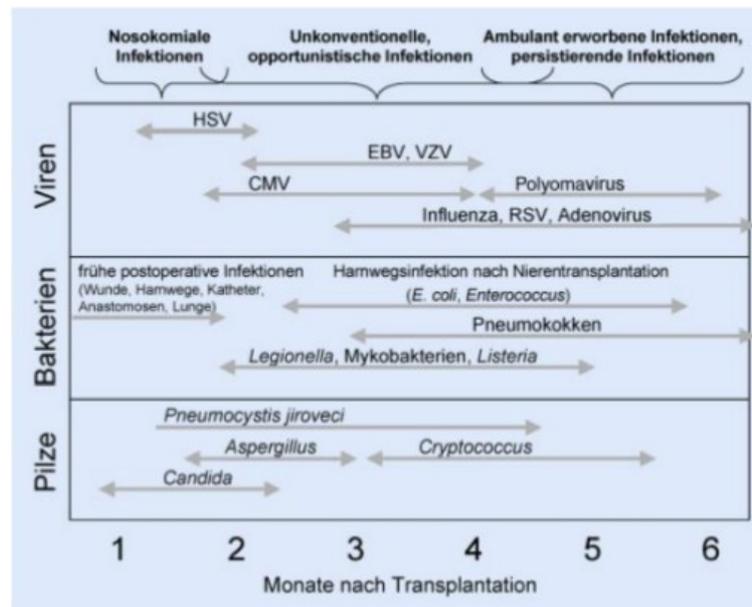


Abb. 1.2: zeitliche Einordnung der Erreger nach Organtransplantation; aus (60)

späten Posttransplantationsperiode (> 6 Monate) sind opportunistische Infektionen durch CMV und EBV seltener zu beobachten, wobei die Gefahr einer respiratorischen Erkrankung durch Streptokokkus pneumoniae und Legionellen noch Jahre nach Transplantation erhöht ist (62).

In einer Studie von Alangaden und Mitarbeitern wurde die Infektionsrate nach Nierentransplantationen untersucht (63). Dabei konnte aufgezeigt werden, dass circa die Hälfte aller Patienten in den ersten 20 Monaten nach Transplantation mit Infektionen zu kämpfen hatten, wobei am häufigsten Harnwegsinfektionen (47%), virale Infektionen (17%), Pneumonien (8%) und Wundinfektionen (7%) auftraten.

1.4.2 Kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen

Zu den am häufigsten auftretenden kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen nach Nierentransplantation gehören Hypertonie, Dyslipidämie sowie die Entwicklung eines Diabetes mellitus.

Kardiovaskuläre Erkrankungen repräsentieren die häufigste Todesursache nach Nierentransplantationen (32,64). Nur bei knapp der Hälfte der noch lebenden Nierentransplantierten (53%) entwickeln sich nach 15 Jahren keine kardiovaskulären Erkrankungen (55). Dabei waren in den USA laut Mitteilung des National Institut of Health im Jahre 2010 etwa 75% der Transplantierten pharmazeutisch mit Betablockern eingestellt (32). Obwohl durch die Nierentransplantation im Vergleich zu Dialysepatienten die Wahrscheinlichkeit eines Myokardinfarktes sinkt, tritt innerhalb der ersten fünf Jahre nach Transplantation bei 45% der Patienten ein akutes Koronarsyndrom auf (65). Durch die frühzeitige Behandlung metabolischer Erkrankungen ist es jedoch möglich, das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse zu reduzieren (66).

Die Inzidenz eines nach Transplantation auftretenden Diabetes mellitus liegt nach zwölf Monaten bei 13%. Als größter Risikofaktor gilt dabei eine neu aufgetretene Hyperlipidämie (67).

1.4.3 Maligne Tumore

Tumore stellen mit ca. 18% aller Todesfälle nach kardiovaskulären Erkrankungen und Infektionen die dritthäufigste Todesursache bei Nierentransplantierten dar (68). Das Risiko für die Entstehung eines Tumors ist bei Nierentransplantierten im Vergleich zur

Normalbevölkerung drei- bis fünffach erhöht (69). Die kumulative Inzidenz nach 15 Jahren liegt für Hauttumoren bei 18% (vor allem Platten- und Basalzelltumore), wobei die kumulative Inzidenz für solide Tumore (Gastrointestinaltrakt, Harnwege, Lunge) bei 14% liegt (68). Brust- und Prostata Tumore sind dagegen im Vergleich zur Normalbevölkerung nicht erhöht (71). Der deutlichste Anstieg an Tumoren wurde für den Nachweis von Tumoren beschrieben, die mit viralen Infektionen zusammenhängen. Dazu gehören Lymphome, Zervixkarzinome und das Karposi-Syndrom (70).

1.5 Transplantatrejektionen

Als weitere Komplikation können Abstoßungsreaktionen auftreten. Diese werden unterteilt in akute Abstoßungsreaktionen und chronische Transplantationsnephropathien. Die auf präformierte Antikörper zurückgehende hyperakute Abstoßungsreaktion (innerhalb von 24 Stunden) spielt aufgrund intensiver Untersuchungen zum anti-HLA Antikörperstatus von Patienten der Organwarteliste und aufgrund der vor einer Nierentransplantation durchgeführten Verträglichkeitsprobe (Crossmatch) nur noch eine untergeordnete Rolle. Sie wird im Kontext der vorliegenden Arbeit nicht weiter betrachtet.

1.5.1 Akute Abstoßungsreaktion

Die akute Abstoßungsreaktion findet innerhalb von Tagen bis Monaten statt. Sie wird in eine früh-akute und eine spät-akute Rejektion eingeteilt, wobei letztere mit einem schlechteren Transplantatüberleben verbunden ist (78). Insgesamt weist die akute Abstoßungsreaktion eine Inzidenz von ca. 5-10% auf (74,79). Eine einheitliche Definition zur Annahme einer akuten Rejektion besteht nicht, jedoch wird sie meist durch einen Anstieg der Serumkreatininmolarität angezeigt. Die Diagnose erfolgt histopathologisch aus einem Biopat.

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) kann für die Kalkulation der Überlebensrate eines Transplantates zurate gezogen werden. So zeigten Meier-Kriesche und Mitarbeiter, dass Patienten, bei denen die GFR dauerhaft erniedrigt war, eine deutlich schlechtere Überlebensrate für das Organ aufwiesen als Patienten, die entweder gar keine oder nur kurzfristige GFR-Senkungen zeigten (50% gegenüber 72-74%) (80).

Zusätzlich wird die akute humorale, d.h. Antikörper vermittelte, von der akuten zellulären

Abstoßungsreaktion unterschieden.

Bei der akuten humoralen Abstoßungsreaktion führen neu generierte Antikörper, die in der Regel einer immunologischen Sekundärreaktion entstammen, zur Generierung einer Immunreaktion am Transplantat. Durch die Aktivierung des Komplementsystems kommt es zur Schädigung des Endothels mit neutrophiler Infiltration in die glomerulären und peritubulären Kapillaren (73,74).

Die akute zelluläre Abstoßungsreaktion basiert auf zwei unterschiedlichen Mechanismen, dem direkten und dem indirekten Reaktionsweg. Bei dem direkten Reaktionsweg werden die HLA-Merkmale des Spenders von den T-Killerzellen direkt erkannt. Auf dem indirekten Weg dagegen präsentieren dendritische Zellen Proteinstücke aus Spenderzellen den T-Helferzellen (72,75). Es wird angenommen, dass eine Toleranzentwicklung sowohl auf dem direkten als auch auf dem indirekten Weg möglich ist (76). Die Schädigung erfolgt zum größten Teil über zytotoxische T-Zellen. Tabelle 1.1 zeigt die histologische Einteilung der zellulären Abstoßungsreaktion nach der Banff-Klassifikation.

Banff-Klassifikation der akuten T-Zell vermittelten Rejektion

Typ Ia: Signifikante interstitielle Infiltration in >25% des Parenchyms mit moderater Tubulitis

Typ Ib: Signifikante interstitielle Infiltration in >25% des Parenchyms mit schwerer Tubulitis

Typ IIa: Auftreten einer milden bis moderaten intimalen Arteriitis

Typ IIb: Auftreten einer schweren intimalen Arteriitis in 25% des Gefäßlumens

Typ III: Auftreten einer schweren transmuralen Arteriitis und/oder Fibrosierung der Arterien mit Medianekrose und lymphozellulärer Infiltration

Tab 1.1: Banff-Klassifikation der akuten T-Zell vermittelten Rejektion (81)

1.5.2 Chronische Transplantatnephropathie

Die chronische Transplantatnephropathie (CTN) tritt nach Monaten bis Jahren auf und ist mit 50-80% aller Abstoßungsreaktionen die Hauptursache eines verringerten Transplantatüberlebens (82,83). Sie wird klinisch definiert als eine Verringerung der Nierenfunktion, Proteinurie und Hypertonie (84). Bioptisch wird die chronische Nephropathie durch eine interstitielle Fibrose und eine tubuläre Atrophie der Niere festgestellt (85). In Tabelle 1.2 ist die Einteilung der CTN nach der Banff-Klassifikation dargestellt.

Bereits nach einem Jahr zeigen sich häufig Vaskulopathien und tubulointerstitielle

Schädigungen. Eine spätere Schädigung tritt anhand von arterieller Hyalinose und Glomerulosklerose ein (84,86). Nankivell und Mitarbeiter konnten in einer Studie mit 120 Patienten zeigen, dass nach zehn Jahren 58% der Transplantierten eine schwere chronische Nephropathie aufwiesen (87).

Generell wird zwischen immunologischen und nicht immunologischen Einflussfaktoren unterschieden. Die immunologischen Faktoren lassen sich in Analogie zur akuten Abstoßungsreaktion in eine humorale und eine zelluläre Reaktion unterscheiden. Bei der chronischen humoralen Abstoßungsreaktion kommt es zur Bildung von zahlreichen Antikörpern, wie z.B. von anti-HLA-Antikörpern oder anti-MHC-Klasse-I-ähnlichen Molekül-Protein-A- (MIC-A-) Antikörpern (74). Die zelluläre chronische Abstoßungsreaktion führt über T_{H1}-Lymphozyten und Makrophagen zu einer chronischen Entzündung des Endothels und einer nachfolgenden Fibrosierung des Interstitiums (88).

Zu den nicht immunologischen Faktoren, die eine CTN bedingen, zählen unter anderem die kalte Ischämiezeit der Niere, nephrotoxische Medikamente wie Calcineurininhibitoren, Infektionen sowie eine arterielle Hypertonie (84,86,89,90).

Banff-Klassifikation der chronischen Rejektion

Typ I:	milde interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (<25% des Kortex)
Typ II:	moderate interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (26-50% des Kortex)
Typ III:	schwere interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (>50% des Kortex)

Tabelle 1.2: Banff-Klassifikation der chronischen Rejektionen (81)

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Nach der Transplantation einer Niere sind die Empfänger aufgrund der drohenden Abstoßungsreaktion auf eine lebenslange Immunsuppression angewiesen. Dabei reichen die Nebenwirkungen der Immunsuppressiva von opportunistischen Infektionen über lebeenseinschränkende Krankheiten wie Diabetes mellitus oder Hypertonie bis hin zu akut lebenslimitierenden Tumoren. Obwohl bekannt ist, dass Empfänger mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur Transplantation immer weniger Immunsuppressiva benötigen, existiert bislang keine Möglichkeit eines Toleranzmonitorings. Mit Hilfe eines geeigneten Testverfahrens wäre es möglich, eine drohende Abstoßungsreaktion frühzeitig zu erkennen. Zudem könnte mit einem derartigen Testverfahren eine individuellere Anpassung der Dosis und Dauer einer immunsuppressiven Therapie festgelegt werden.

Ziel der Arbeit war die Messung und das Monitoring der zellulären Immunität der Transplantatempfänger vor und nach Transplantation. Dabei sollten die PBMC der Empfänger mit den bestrahlten PBMC der Spender gemischt werden. Anhand des Elispot-Verfahrens wurden die beiden proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-17 untersucht, mit dem Ziel, gegebenenfalls Voraussagen zur Akzeptanz bzw. zur Abstoßung der gespendeten Niere machen zu können.

Methodisch sollte dafür:

- 1) ein Elispot-Verfahren zur relativen Quantifizierung von IFN- γ und IL-17 etabliert werden,
- 2) dieses Verfahren an eine Lymphozytenmischreaktion (MLR) angepasst werden,
- 3) die Methode an transplantierte Patienten adaptiert werden,
- 4) der prä- und postoperative Verlauf von IFN- γ und IL-17 im Elispot-Verfahren gemessen werden,
- 5) die Messergebnisse von IFN- γ und IL-17 untereinander und mit den klinischen Transplantatverläufen verglichen werden,
- 6) untersucht werden, ob mit Hilfe dieses Testverfahrens vor Transplantation eine Aussage über die Annahmewahrscheinlichkeit getroffen werden kann,
- 7) untersucht werden, ob mit Hilfe des Testverfahrens nach Transplantation eine anstehende Abstoßungsreaktion der implantierten Niere zu identifizieren ist.

2 Materialien und Methoden

2.1 Studiendesign

Nach Genehmigung der Ethik Kommissionen der medizinischen Fakultäten an den Universitätskliniken Leipzig (Nr. 361-2008) und Halle/Saale (Nr. 2012-22) wurden in den Jahren 2008 bis 2012 insgesamt 17 Empfänger von Lebendnierenspenden sowie die dazugehörigen Spender in eine prospektive Längsschnittstudie eingeschlossen. Die Lebendnierentransplantationen erfolgten in der dazugehörigen chirurgischen (Leipzig) bzw. urologischen (Halle/Saale) Kliniken.

Die Blutentnahmen der Patientenpaare erfolgten mittels Lithium-Heparin Röhrchen. Um eine ausreichende Zellzahl untersuchen zu können, wurden bei den immunsupprimierten Patienten an jedem definierten Tag ein Gesamtvolumen von bis zu 36 ml (vier 9 ml Lithium-Heparinröhrchen) abgenommen. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Zeitpunkte der Blutentnahmen

Transplantation am Tag 0 (Abweichung)	Spender*	Empfänger
Zeitpunkt A: vor Transplantation	X	X
Zeitpunkt B: Tag +21 (+/-3)	X	X
Zeitpunkt C: Tag +28 (+/-3)	X	X
Zeitpunkt D: Tag 75 (+/-15)	X	X

Tab. 2.1: Zeitpunkte der Blutentnahmen; *bei den Spendern wurden von vier möglichen nur zwei bis drei Blutentnahmen durchgeführt

Aus dem gewonnenen Blut wurden im immunologischen Labor der Universität Leipzig PBMC separiert und bei -196°C eingefroren. Die PBMC eines Paares wurden gleichzeitig aufgetaut und im Elispot-Verfahren hinsichtlich der Ausschüttung der beiden Zytokine IFN- γ und IL-17 untersucht.

Zudem wurden folgende Patientendaten erfasst: Alter, Geschlecht, Verwandtschaftsgrad, Kompatibilität der HLA-Merkmale zwischen Spender und Empfänger, Medikation, frühere Transplantationen, sowie die Serumkreatininmolarität im Verlauf.

2.2 Materialien

Vitalitätsfärbung in der Durchflusszytometrie

Substrate und Enzyme	
7AAD	Invitrogen, Darmstadt
CD45 FITC	Beckman Coulter, Krefeld
Puffer und Medien	
PBS, unsteril	Biochrom Seromed KG, Berlin
Laborgeräte und Software	
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Software (Cell Quest Pro)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

IFN- γ - und IL-17 Elispot

Reagenzien und Medien	
DMSO	Merck KG, Hohenbrunn
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
FKS	Biochrom Seromed KG, Berlin
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
LMS-1077	PAA Laboratories GmbH, Österreich
PBS, steril	Biochrom Seromed KG, Berlin
RPMI-1640	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Tween 20	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, München
X-Vivo 15	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Substrate und Enzyme	
BCIP/NBT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Streptavidin-Alkalische Phosphatase	Mabtech AB, Hamburg
Antikörper und Antigene	
Anti-Human IFN- γ mAb 1-D1K	Mabtech AB, Hamburg

Anti-Human IFN- γ mAb 7-B6-1, biotinylated	Mabtech AB, Hamburg
Anti-Human IL-17A Functional Grade Purified	eBioscience, Frankfurt
Anti-Human IL-17 Biotin	eBioscience, Frankfurt
Interleukin-2	eBioscience, Frankfurt
OKT3 (Orthoclone®)	Janssen Cilag GmbH, Neuss
PHA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Laborgeräte und Software	
AID iSpot FluoroSpot Reader System	AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Straßberg
AID Elispot Software iSpot 5.0	AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Straßberg
Einfrierbox	Nalgene® Nunc International, Rochester, USA
Einwegpipetten	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Inkubationsschrank (HeraCell® 150i)	Thermo Scientific, Langenselbold
Kryoröhrchen (Cryovidal®)	Simport, Kanada
Multikanalpipetten (100 - 200 μ l)	Eppendorf AG, Hamburg
Multiscreenplatten (Multiscreen HTS -IP MSIPS4510)	Millipore, Bredford, USA
Neubauer-Zählkammer	Fein Optik, Bad Blankenburg
Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Präzisionspipetten (2 – 1000 μ l)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5 – 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht
Standardspitzen (10, 100, 1000 μ l)	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilbank	Clean Air Techniek B.V., Woerden, Niederlande
Sterile Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Sterilpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Variable Pipetten (100 – 1000 μ l)	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht
Zentrifuge (Rotina 48RS)	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge (Rotina 46RS)	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

2.3 Methoden

2.3.1 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen wurden nach Einwilligung der Patienten sowohl stationär als auch ambulant in den Universitätskliniken Leipzig und Halle/Saale durchgeführt. Eine Einwilligung der jeweiligen Ethik-Kommission lag sowohl für die Patienten als auch für gesunde Freiwillige vor. Mittels Lithium-Heparin Röhrchen wurden an einem Tag bis zu 36 ml Blut pro Patient abgenommen.

2.3.2 Lymphozytenseparation

Die PBMC wurden innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme im immunologischen Labor des Universitätsklinikums Leipzig unter sterilen Bedingungen aus dem heparinisierten Vollblut separiert.

Zunächst erfolgte das Mischen des Vollbluts mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) im Verhältnis 1:2. Diese Lösung wurde in sterilen Röhrchen (15 ml) auf 3 ml Lymphozytenseparationsmedium (LSM)-1077 aufgetragen. Bei LSM-1077 handelt es sich um ein Separationsmedium mit einer Dichte von 1.077 g/ml auf Ficolbasis für die Herstellung von Dichtegradienten. Anschließend erfolgte das Auftrennen der einzelnen Zellpopulationen des Blutes durch die Zentrifugation. Dabei wurde die Zentrifugation wie folgt durchgeführt: Erdbeschleunigung (g): 550; Zeitdauer: 25 min; Beschleunigung (l): 1; Bremsstärke (λ): 0; Umgebungstemperatur: 22°C. Während der Zentrifugation passieren die Erythrozyten und Granulozyten das Separationsmedium, die PBMC verbleiben zwischen dem LSM-1077 und dem Serum (=Interphase). Diese Interphase wurde vorsichtig mit einer sterilen Einwegpipette entnommen und in PBS gefüllten Röhrchen (15 ml) zentrifugiert (350g|10 min|6|6|22°C). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit den enthaltenden PBMC in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (300g|10 min|9|9|22°C). Nach Entfernung des Überstandes wurden 50 µl der resuspendierten PBMC entnommen und in der Neubauer Zellkammer gezählt, während die restlichen Zellen erneut in mit PBS gefüllten 15 ml-Röhrchen zentrifugiert wurden (300g|10 min|9|9|22°C).

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl der PBMC-Suspension mit 50 µl Trypanblau gemischt und in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Im Lichtmikroskop wurden tote von vitalen Zellen unterschieden - Trypanblau färbt nur die toten Zellen aufgrund der gesteigerten Membranpermeabilität blau. Somit konnte die Anzahl vitaler Zellen bestimmt werden. Dafür wurden 16 Kleinquadrate in diagonaler Richtung unter 10-facher Vergrößerung gezählt. Die Gesamtzellmenge ergibt sich wie folgt:

$$A = B \times 10^4 \times VF \times V$$

A = Zellanzahl / ml

B = Zellanzahl der 16 ausgezählten Kleinquadrate

VF = Gesamtvolumen der Zellsuspension (ml)

V = Verdünnungsfaktor, 1:2

2.3.4 Kryokonservierung der Zellen

Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die PBMC in 900 µl fötalem Kälberserum (FKS) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in beschriftete und auf Eis vorgelagerte Kryoröhrchen gegeben. Der Zellsuspension wurden 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (final 10% vol/vol) hinzugefügt. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen und wirkt dadurch kryoprotektiv. Die fertigen Kryoröhrchen wurden in eine auf 4°C gekühlte und mit Isopropanol gefüllten Nalgene®-Einfrierbox gestellt und bei -80°C eingefroren. Nach 24-48 Stunden wurden sie aus der Nalgene Box entnommen und in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Aus der Literatur ist ersichtlich, dass eine Kryokonservierung mit nachfolgender Rekultivierung von PBMC keinen negativen Einfluss auf die Zytokinsekretion der Zellen ausübt (91,92).

2.3.5 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Zur Vorbereitung wurde für jedes aufzutauende Kryoröhrchen zunächst 20 ml Medium (RPMI 1640 + 10% FKS) auf 37°C vorgewärmt und 5 ml davon in ein steriles Röhrchen

(15 ml) gegeben. Zudem wurde ein Wasserbad (37°C) bereitgestellt.

Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstoffbehälter genommen und im Wasserbad platziert. Sobald etwa die Hälfte der Zellsuspension aufgetaut war, wurden die Zellen in das vorbereitete 15 ml Röhrchen überführt, das Röhrchen mit vorgewärmtem Medium aufgefüllt und zentrifugiert (300 RPM|10 min|9|9|22°C). Danach wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mit warmem Medium resuspendiert, mit Medium aufgefüllt und erneut zentrifugiert (300 RPM|10 min|9|9|22°C). Diese Waschschriffe mussten schnell durchgeführt werden, um das zytotoxisch wirkende DMSO zu entfernen. Der Vorgang wurde wiederholt, wobei nun 50 µl der Lösung nach Resuspendierung des Zellpellets für das Zählen der Zellen entnommen und gezählt wurden (siehe 2.2.3). Nach beendeter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die PBMC auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

2.3.6 Bestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung von PBMC erfolgte in der Transfusionsmedizin des Uniklinikums Leipzig, wobei die fertig eingestellten Zellen in einem 15 ml Röhrchen mit 30 Gray (Gy) bestrahlt wurden. Als Strahlungsquelle wurde ein ¹³⁷Cs Irradiator (IBL-437) der Firma Cis Bio International verwendet.

2.3.7 Stimulanzen

Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) gilt als klassischer Wachstumsfaktor der T-Zellen. Dabei wirkt es sowohl für T_{H1}-Zellen als auch an T_{H2}-Zellen stark proliferativ. Zudem fördert es das Überleben von T_{reg}-Zellen, stimuliert NK- und B-Zellen, wirkt allerdings durch die Aktivierung des Fas-Liganden an zytotoxischen T-Zellen auch apoptotisch (93).

Sobald IL-2 an seinen Rezeptor bindet, wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-5 endet. Dieser bewirkt im Zellkern unter anderem die Neubildung von IL-2 und seines Rezeptors sowie eine Bildung von NK-Zell-assoziierten Zytokinen wie z.B. IFN-γ (94).

OKT3

OKT3 ist ein muriner monoklonaler IgG2a-Antikörper, der an den CD3-Korezeptor bindet. Als Teil des TCR-Komplexes ist das CD-3 Molekül zusammen mit der δ -Kette des T-Zell-Rezeptors zuständig für die transmembrane Signaltransduktion in das Innere der Zelle. Somit löst er zusammen mit dem TCR und kostimulierenden Rezeptoren (CD28/CD4) zahlreiche Signalkaskaden aus. Dazu gehört auch die Dephosphorylierung und damit Aktivierung der NF-AT-Familie, die für die Transkription von IL-2 verantwortlich ist (18).

Generell unterdrückt OKT3 durch die Hemmung des CD3-Rezeptors die T-Zell-Proliferation und zeigt somit einen immunsupprimierenden Effekt. Dennoch konnten zahlreiche Studien zeigen, dass OKT3 initial über die Heraufregulierung der IL-2-Rezeptoren auf der Zelle zu einer T-Zell-Stimulation führt (95–98). OKT3 wird heutzutage als Therapeutikum bei steroidresistenten akuten Transplantatabstoßungsreaktionen verwendet (99).

Es bleibt festzuhalten, dass OKT3 zunächst die Zytokinproduktion stimuliert, wobei seine Wirkung nach kurzer Zeit in eine immunsuppressive Wirkung übergeht (95,98). Für den Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit wird der primäre Effekt der Zytokinfreisetzung genutzt, um die Sekretion von IL-17 zu erhöhen.

Phytohämagglutinin

Phytohämagglutinin (PHA) ist ein Glykoprotein und stammt aus der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris*. Als Mitogen wirkt es stark proliferativ auf humane T-Lymphozyten (100,101). Bereits 1965 wurde es als Stimulanz für IFN- γ Ausschüttung beschrieben (102). In der vorliegenden Arbeit wurde PHA als stark proliferatives Mitogen für die Positivkontrollen der PBMC von Spendern und Empfängern verwendet.

2.3.8 Durchflusszytometrie

Anhand der Durchflusszytometrie kann eine Separation und Analyse von Zellen vorgenommen werden. Das Verfahren wurde Ende der 1960er Jahre in Stanford, USA entwickelt (103). In einem Flüssigkeitsstrom passieren einzelne Zellen verschiedene Laser. Dabei kann durch die Detektion des Vorwärtsstreulichts (FSC) die Größe und durch die Detektion des Seitwärtsstreulichts (SSC) die Granularität der jeweiligen Zelle gemessen werden.

Für die Vitalitätsuntersuchung wurden die Fluoreszenzfarbstoffe FITC (in an einen anti-CD45 monoklonalen Antikörper gekoppelter Form) und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) verwendet. Der monoklonale FITC-konjugierte anti-CD45-Antikörper bindet an das CD45-Molekül, das auf nahezu allen Immunzellen exprimiert wird, unter anderem auch auf T-Lymphozyten (104). 7-AAD dagegen bindet an die beiden Nukleotide Cytosin und Guanin, kann jedoch nicht die Zellmembran vitaler Zellen passieren und färbt daher nur die DNA-Bausteine apoptotischer und toter Zellen (105).

Versuchsaufbau

Für die Vitalitätsmessung der bestrahlten Zellen wurde 100 µl der Zellsuspension zusammen mit 2,5 µl CD45-FITC und 1,6 µl 7-AAD in ein Rundbodenröhrchen (FACS-Röhrchen) pipettiert.

Das Rundbodenröhrchen wurde nach Zugabe der beiden Antikörper bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Anschließend wurden 300 µl PBS hinzugegeben. Für das Auslesen und die Auswertung wurden das FACS-Calibur-Durchflusszytometer und die Cell Quest Pro Software verwendet.

2.3.9 Elispot-Assay

Der Enzyme Linked Immuno Spot Assay (Elispot-Assay) wurde erstmalig 1983 durch zwei unterschiedliche Forschergruppen in Schweden und Australien beschrieben (106,107).

Er ermöglicht die Betrachtung zellulärer Zytokinproduktion auf Einzelzellbasis. Dabei detektiert er die von einer einzelnen Zelle sezernierten Proteine (z.B. Zytokine) und bestimmt damit sowohl die Quantität als auch die Qualität einer Immunantwort spezifischer Zellpopulationen. Jeder Spot auf der Elispot-Platte kann einer spezifischen Zelle zugeordnet werden, womit in der Summe die antigenspezifische Antwort eines Zelltyps nachzuweisen ist.

Der Elispot-Assay zeichnet sich durch seine hohe Sensitivität aus, welche aufgrund des langen Monitoringzeitraums bis zu 200-fach höher liegt als die eines Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) (108). Zudem benötigt der Elispot-Assay eine zehnmal geringere Zellzahl als die Durchflusszytometrie (109). Durch die hohe Sensitivität unter Verwendung von nur 1×10^5 PBMC besitzt er eine große Bedeutung in der medizinischen Diagnostik (110). So findet der Elispot-Assay heutzutage bei der Impfstoffentwicklung, der

Tumordiagnostik, der HIV-Diagnostik, der Allergie- und Transplantationsforschung sowie zur Diagnose von Autoimmunerkrankungen ein äußerst breites Einsatzfeld (111–117). Standardisiert wurde auch ein Elispot basierendes Testverfahren zur Diagnose einer latenten Tuberkulose (118–120). Obwohl das komplexe und zeitaufwendige Verfahren des Elispots die Gefahr von großen laborbedingten Variabilitäten bietet, ist durch Standardisierungsverfahren eine vergleichende Untersuchung möglich (121).

Für die Untersuchung der Zytokine IFN- γ und IL-17 im Elispot-Verfahren wurde ein Zeitraum von vier Tagen festgesetzt. Die ersten drei Tage wurde steril unter einer Sicherheitswerkbank gearbeitet, während die Arbeitsschritte des letzten Tages im unsterilen Bereich des immunologischen Labors erfolgten. Die PBMC eines jeden Patientenpaares wurden jeweils zeitgleich auf eine mit anti-IFN- γ -Antikörpern und eine mit anti-IL-17-Antikörpern beschichtete Elispot-Platte aufgetragen. Als Platten wurden sterile 96-Well Multitestplatten von Millipore Corp. mit Polyvinylidenfluorid (PVDF-) Membran verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Proben mit einem monoklonalen biotinylierten anti-IFN- γ - bzw. anti-IL-17-Antikörper versetzt. Durch die Zugabe von Streptavidin-Alkalische-Phosphotase und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumsalz (BCIP/NBT-plus) konnten die einzelnen Spots sichtbar gemacht werden. Das Auslesen erfolgte mit Hilfe eines AID-Readers (AID iSpot FluoroSpot Reader System / AID Elispot Software iSpot 5.0).

Die Bestimmungen erfolgten in der Regel dreifach. Aufgrund zu geringen Patientenmaterials mussten die Messungen teilweise auf eine Zweifachbestimmung reduziert werden. Als Negativkontrollen fungierten die unstimulierten Lymphozytenzellkulturen (Leerwerte), als Positivkontrollen dienten Zellen, die mit dem Mitogen PHA stimuliert worden waren.

Versuchsaufbau

Tag 1

Zuerst erfolgte das Aktivieren der PVDF-Membran auf der Elispot-Platte mit jeweils 30 μ l Ethanol (35%) pro Napf für 1-2 Minuten, da das Plattenmaterial hydrophobe Eigenschaften aufweist. Anschließend wurden 150 μ l PBS dazu pipettiert, und die Näpfe der Platten noch zweimal mit der gleichen Menge PBS ausgewaschen. Nun erfolgte die Beschichtung der Näpfe mit dem jeweiligen Antikörper (Coating). Für die Untersuchung von IFN- γ wurden

60 µl anti-IFN-γ-Antikörper (10 µg/ml) zu 6 ml PBS pipettiert und davon insgesamt 60 µl in jeden Napf gegeben. Für die Untersuchung von IL-17 wurden vorab 10 ml PBS mit 50 µl anti-IL-17 Antikörper (10 µg/ml) gemischt und in jeden zu beschichtenden Napf 100 µl dieser Lösung gegeben. Dadurch konnte die Membranoberfläche der einzelnen Näpfe mit Antikörpern bedeckt werden. Die Platten wurden in Folie eingewickelt und bei 4°C über Nacht in einen Kühlschrank gelegt.

Tag 2

Nach Inkubation über Nacht wurde die Antikörperlösung aus den Näpfen ausgeschüttet. Für das Entfernen der ungebundenen Antikörper wurden die Platten dreimal mit jeweils 200 µl PBS gewaschen. Weiterhin wurden die Näpfe mit 150 µl Medium (RPMI 1640 + 10% FKS) im Inkubationsschrank bei 37°C (5% CO₂) für jeweils zwei Stunden geblockt. Somit konnte die restliche noch unbelegte Oberfläche der Membran eines jeden Napfes geblockt und eine „unspezifische“ Anlagerung der nachfolgend verwendeten Antikörper an das Trägermaterial verhindert werden (Blocking).

Die Zellen wurden aus dem Stickstoff geholt, aufgetaut und gezählt (siehe 2.3.3, 2.3.5). Eine Hälfte der jeweiligen PBMC der Spender wurden mit 30 Gy bestrahlt, die andere Hälfte wurde nicht bestrahlt (siehe 2.3.6). Anschließend wurden die PBMC der Empfänger sowie die bestrahlten und unbestrahlten PBMC der Spender auf drei Zellkonzentrationen eingestellt: $1,33 \times 10^6$ /ml, 2×10^6 /ml sowie $2,66 \times 10^6$ /ml.

Als Grundstimulator für die Messung von IL-17 wurde der monoklonale Antikörper OKT3 ausgewählt. Die Konzentration des OKT3 wurde mit Hilfe von Medium (RPMI 1640 + 10% FKS) auf 0,1 µg/ml eingestellt. Als Grundstimulator für die Messung von IFN-γ wurde das Zytokin IL-2 in einer Konzentration von 25 IU/ml verwendet. Die Zugabe von IL-2 erfolgte erst nach 24 Stunden Inkubationszeit.

Nun wurden die PBMC in die Näpfe der Elispot-Platten gegeben. Die bestrahlten und unbestrahlten PBMC der Spender sowie die PBMC der Empfänger wurden zunächst separat aufgetragen. Anschließend wurden verschiedene PBMC für die beabsichtigten Lymphozytenmischreaktionen zusammen in die Näpfe pipettiert. Dabei wurden die bestrahlten und unbestrahlten PBMC der Spender zu den jeweiligen PBMC der Empfänger (Zeitpunkt A-D; siehe 2.1) gegeben. In Tabelle 2.2 sind die verschiedenen Pipettierschemata für IFN-γ und IL-17 mit den Endkonzentrationen der Zellen und den dazugehörigen Zytokinen/Stimulanzen dargestellt.

PBMC-Konzentrationen der unterschiedlichen Nöpfe					
Zyto-kin	Bezeichnung des Napfes	Reagenz 1 (Konzentration)	Reagenz 2 (Konzentration)	Reagenz 3 (Konzentration)	Endkonzentration PBMC (Antigen bzw. Mitogen)
IFN- γ	LW	75 μ l PBMC (2,66x10 ⁶ /ml)	75 μ l Medium	50 μ l Medium*	1x10 ⁶ /ml
IFN- γ	stimulierte LW	75 μ l PBMC (2,66x10 ⁶ /ml)	75 μ l Medium	50 μ l IL-2 (100 IU/ml)*	1x10 ⁶ /ml (25 IU/ml)
IFN- γ	Positivkontrolle	100 μ l PBMC (2x10 ⁶ /ml)	100 μ l PHA (10 μ g/ml)	-	1x10 ⁶ /ml (5 μ g/ml)
IFN- γ	MLR	75 μ l PBMC (2,66x10 ⁶ /ml)	75 μ l PBMC B (2,66x10 ⁶ /ml)	50 μ l Medium*	2x10 ⁶ /ml
IFN- γ	stimulierte MLR	75 μ l PBMC (2,66x10 ⁶ /ml)	75 μ l PBMC B (2,66x10 ⁶ /ml)	50 μ l IL-2 (100 IU/ml)*	2x10 ⁶ /ml (25 IU/ml)
IL-17	LW	100 μ l PBMC (1x10 ⁶ /ml)	100 μ l Medium	-	5x10 ⁵ /ml
IL-17	stimulierte LW	100 μ l PBMC (1x10 ⁶ /ml)	100 μ l OKT3 Reagenz	-	5x10 ⁵ /ml
IL-17	Positivkontrolle	100 μ l PBMC (1x10 ⁶ /ml)	100 μ l PHA (10 μ g/ml)	-	5x10 ⁵ /ml (5 μ g/ml)
IL-17	MLR	50 μ l PBMC (2x10 ⁶ /ml)	50 μ l PBMC B (2x10x10 ⁶ /ml)	100 μ l Medium	1x10 ⁶ /ml
IL-17	stimulierte MLR	50 μ l PBMC (2x10 ⁶ /ml)	50 μ l PBMC B (2x10x10 ⁶ /ml)	100 μ l OKT3 Antigen (0,1 μ g/ml)	1x10 ⁶ /ml (0,05 μ g/ml)

*nach 24 Stunden Inkubation hinzugegeben

Tab. 2.2: PBMC-Konzentrationen für die unterschiedlichen Nöpfe, LW = Leerwert, MLR = Lymphozytenmischreaktion

Insgesamt ergab sich ein finales Volumen von 200 μ l je Napf.

Nach erfolgter Pipettierung wurden die beiden Platten für 48 Stunden (IL-17) bzw. für 24 Stunden (IFN- γ) bei 37°C und 5% CO₂ (100% Feuchtigkeit) inkubiert.

Tag 3

Am dritten Tag erfolgte die Zugabe des Antigens IL-2 (eBioscience) auf die IFN- γ -Platte. Dafür wurde Interleukin-2 mit Hilfe von Medium auf eine Konzentration von 100 IU/ml eingestellt, und anschließend 50 μ l in die Antigen-Näpfe pipettiert (siehe Tab. 2.2). Zudem wurden zum gleichen Zeitpunkt ebenfalls 50 μ l reines Medium in die Näpfe der Negativ- und Positivkontrollen gegeben. Die IFN- γ -Platte wurde danach für weitere 24 Stunden in den Inkubationsschrank gestellt.

Tag 4

Nach insgesamt 48 Stunden Inkubation wurden beide Platten aus dem Inkubationsschrank genommen, ausgeschüttet und zunächst sechsmal mit 200 μ l PBS + 0,01% Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die biotinylierten Antikörper in PBS auf eine Konzentration von 2 μ g/ml eingestellt. In jeden Napf der IFN- γ -Platte wurden davon 60 μ l pipettiert. Für die IL-17-Platte wurde ebenfalls eine PBS gepufferten Antikörperlösung (2 μ g/ml) verwendet, wobei jeweils 100 μ l dieser Antikörper-Lösung in jeden Napf gegeben wurde. Dadurch konnte der biotinylierte Antikörper das jeweils ausgeschüttete Zytokin binden. Anschließend wurden die Platten in Folie eingepackt und für weitere drei Stunden in den Inkubationsschrank gestellt.

Nun erfolgte das Ausschütten der Lösungen sowie das sechsmalige Waschen der Näpfe mit jeweils 200 μ l PBS + 0,01% Tween 20. Danach wurden 20 μ l Streptavidin-Alkalische-Phosphatase mit 20 ml PBS gemischt (1 μ g/ml) und hiervon jeweils 100 μ l in jeden Napf pipettiert. Die Platten wurden nun bei Raumtemperatur für 50 Minuten im Dunkeln gelagert, damit das Streptavidin an die Biotinstelle des Antikörpers binden konnte. Nach diesen 50 Minuten erfolgte ein erneutes Waschen, zunächst dreimal mit PBS + 0,01% Tween 20, anschließend dreimalig mit reinem PBS. Nach der Entfernung des AP-konjugierten Streptavidins aus den Näpfen wurden direkt ohne weitere Waschschriffe 75 μ l des Substrates BCIP/NBT-plus hinzugegeben und die Platten für weitere 10-25 Minuten im Dunkeln inkubiert. So konnte in einem letzten Schritt das Substrat BCIP/NBT-plus durch das Streptavidin-gebundene Enzym alkalische Phosphatase umgesetzt werden, um als Präparat einen sichtbaren Spot zu bilden.

Sobald die Spots mit bloßem Auge erkennbar waren, wurden die Platten sorgfältig unter fließendem voll-entsalztem (VE-) Wasser mindestens 10x sorgfältig gewaschen. Danach wurde der Membrenschutz am

Boden der Platten entfernt und der Boden noch einmal mit VE-Wasser abgewaschen. Die Platten wurden anschließend getrocknet und im Fluorospot-Reader ausgelesen. Die Einstellungen der Auswertungskriterien sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Einstellungen des Fluorospot-Readers

	Intensität	Größe	Gradient
IFN- γ	30.09.55	40/5000	01.01.90
IL-17	25/255	40/5000	01.01.90

Tab. 2.3: Einstellungen des Fluorospot-Readers

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Patienten

In den Jahren 2009-2012 wurden insgesamt 12 Patientenpaare zur Durchführung einer Lebendniere spende aus den Universitätskliniken Leipzig und Halle/Saale in die vorliegende Studie eingeschlossen. Von ursprünglich 17 Paaren konnten fünf Paare insbesondere aus technischen Gründen nicht in die Auswertung aufgenommen werden.

Charakteristika der Patienten		
Alter (Jahren)	<u>Durchschnitt</u>	<u>Altersbereich</u>
Spender	48,4	24-64
Empfänger	38,3	19-68
insgesamt	43,4	19-68
Geschlecht	<u>männlich</u>	<u>weiblich</u>
Spender	2	10
Empfänger	11	1
insgesamt	13	11
Beziehung der Patientenpaare	<u>genetisch verwandt</u>	<u>genetisch nicht verwandt</u>
	7x	5x
Rejektionsepisoden (nach 6 Monaten)		0
frühere Transplantationen		0

Tab. 3.1: Charakteristika der Spender-Empfänger-Paare; Tx = Transplantation

Serumkreatininmolarität der Transplantatempfänger im Verlauf						
Tag (0d=Tx)	<u>vor Tx</u>	<u>14-15 d</u>	<u>17-22 d</u>	<u>28-30 d</u>	<u>41-43 d</u>	<u>69-86 d</u>
Durchschnitt ($\mu\text{mol/l}$)	645,6	121,7	182,6	188,7	126	128,8
Median ($\mu\text{mol/l}$)	649,5	128	127,5	124	125,5	128
Bereich der gemessenen Molarität ($\mu\text{mol/l}$)	411-1105	108-129	94-590	99-312	123-128	96-170
Fallzahl	12	3	8	8	2	11

Fortsetzung Tab. 3.1: Charakteristika der Spender-Empfänger-Paare; Tx = Transplantation

HLA-Antigen-spezifische Charakteristika der Patienten								
A-B-DR Mismatchformel								
	0-0-0	0-2-1	1-1-1	1-1-2	1-2-2	2-2-2		
Anzahl	1x	1x	6x	1x	1x	2x		
anti-HLA-Antikörperstatus								
	positiv			negativ				
drei Monate nach Tx	-			12				
HLA-Typisierung								
Merkmale	Klasse I				Klasse II			ABDR-Mismatch-Formel
Genloci	A	B	Bw4	Cw	DR	DR	DQ	
E 1	1/28	18/51	4/6	7	11	52	3	1-1-1
S 1	32/28	18/14	6	7/8	7/11	52/53	2/3	
E 2	2/26	7/62	6	3/7	4/15	51/52	3/6	0-0-0
S 2	2/26	7/62	6	3/7	4/15	51/53	3/6	
E 3	2/24	13/44	4	5	4/7	53	2/3	1-1-1
S 3	24/30	13/50	4/6	6	1/7	53	2/5	
E 4	2/32	7/35	6	4/7	1/7	53	2/5	2-2-2
S 4	3/24	44/62	4/6	-	4/12	52/53	3/3	

Tab. 3.2: Gegenüberstellung der Klasse-I und -II HLA-Merkmale der Spender-Empfänger-Paare; Tx=Transplantation; E = Empfänger, S = Spender

E 5	2	51/62	4/6	1/3	13/15	51/52	6	1-1-1
S 5	1/2	57/62	4/6	3/6	7/13	52/53	6/3	
E 6	2/30	13/44	4	5/6	4/7	53	2/3	1-1-1
S 6	2/25	18/44	4/6	5	4/13	52/53	6	
E 7	3	7/35	6	4/7	10/14	52	5	1-1-2
S 7	3/31	7/51	4/6	7	11/15	51/52	3/6	
E 8	2/33	57/58	4	3/6	13	52	6	1-1-1
S 8	3/33	58/62	4/6	3	4/13	52/53	3/6	
E 9	11/24	35/51	4/6	12/14	4/8	53	3/4	1-2-2
S 9	24/29	44/56	4/6	3	7/9	53	3	
E 10	1/2	15/52	4/6	3	4/13	52/53	3/6	0-2-1
S 10	1/2	57/60	4/6	3/6	7/13	52/53	3/6	
E 11	1/24	8/61	6	2/7	11/3	52	2/3	1-1-1
S 11	1/29	8/44	4/6	6	7/3	52/53	2/3	
E 12	11/32	7/40	6	2/7	13/15	51/52	6	2-2-2
S 12	23/24	35/49	4/6	4/7	7/14	52/53	2/5	

Fortsetzung Tab. 3.2: Gegenüberstellung der Klasse-I und -II HLA-Merkmale der Spender-Empfänger-Paare; Tx = Transplantation, S = Spender, E = Empfänger

Als Funktionsparameter der implantierten Niere wurde die Serumkreatininmolarität im Verlauf bestimmt. Hierbei mussten jedoch weitere zeitliche Unterteilungen vorgenommen werden. Bei einigen Empfängern wurde die Bestimmung der Serumkreatininmolarität nicht zum gleichen Zeitpunkt wie die Blutabnahme für die Untersuchung der PBMC im Elispot vorgenommen (siehe Tab. 3.1). Bei einem Spender-Empfänger-Paar waren Blutentnahmen drei und vier Wochen postoperativ nicht möglich. Daher wurde das Blut bei diesen Empfängern in der zweiten bzw. siebten Woche postoperativ abgenommen. Bei zwei weiteren Spender-Empfänger-Paaren erfolgte in der dritten bzw. in der vierten Woche postoperativ keine Blutentnahme. Die Gründe waren auf postoperative Komplikationen und zeitliche Nicht-Verfügbarkeit (z.B. aufgrund einer Kur) zurückzuführen. Bei den restlichen neun Patientenpaaren konnten die Blutentnahmen wie geplant durchgeführt werden.

Bezüglich der Serumkreatininmolarität ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen genetisch verwandten und genetisch nicht verwandten Spender-Empfänger-Paaren. Allein ihr Median vor Transplantation zeigte bei den genetisch nicht verwandten Spender-Empfänger-Paaren einen etwas geringeren Wert von 507 $\mu\text{mol/l}$ im Vergleich zu 680 $\mu\text{mol/l}$ bei den genetisch verwandten Paaren (Wilcoxon-Test: $p=0,5$). Die

Serumkreatininmolarität zum Zeitpunkt D (69-86d; vgl. Tab. 3.1) zeigte nahezu identische Werte (Mediane: genetisch verwandt: 133 µmol/l | genetisch nicht verwandt: 127 µmol/l). Zudem wurde eine HLA-Typisierung der Paare durchgeführt und die Empfänger auf die Bildung von anti-HLA-Antikörpern d.h. auf eine auf diese Weise gegebenenfalls manifeste humorale Transplantat-spezifische Immunreaktion untersucht (Tab 3.2).

3.2 Medikamentöse Therapieschemata nach Nierentransplantationen

Alle Empfänger bekamen als Immunsuppression nach „klassischem Schema“ eine Dreifachkombination aus Tacrolimus, Prednisolon und Mycophenolat-Mofetil (MMF). Tabelle 3.3 zeigt das Standardschema der Immunsuppression bei Lebendnierenspenden in Leipzig und Halle/Saale aus den Jahren 2009-2012.

Medikamentöse Therapieschemata		
	Uniklinik Leipzig	Uniklinik Halle/Saale
Medikation	Tacrolimus + MMF + Steroide	Tacrolimus + MMF + Steroide
Tacrolimus		
Startdosis	0,2 mg/kg/d p.o.	0,02 mg/kg /d i.v.
Zielkonzentration	8-12 ng/ml	10-13 ng/ml
Woche 1-3		
Zielkonzentration	7-8 ng/ml	5-10 ng/ml
bis 6.Monat		
Mycophenolat-Mofetil	2 x 1000 mg	2 x 1000 mg
ab Tag 21	nach Blutbild und Komedikation	2 x 500 mg

Tabelle 3.3: Immunsuppression bei Lebendnierenspenden an den Universitätskliniken Leipzig und Halle/Saale, MMF = Mycophenolat-Mofetil, p.o. = per os, i.v. = intravenös

Steroide	Uniklinik Leipzig	Uniklinik Halle/Saale
Tag 0	Methylprednisolon i.v. 500 mg	Methylprednisolon i.v. 500 mg
Tag 1	Methylprednisolon i.v. 250 mg	Methylprednisolon i.v. 125 mg
Tag 2	Methylprednisolon i.v. 125 mg	Prednisolon p.o. 20 mg
Tag 3-5	Prednisolon p.o. 50 mg	Prednisolon p.o. 20 mg
Tag 6-8	Prednisolon p.o. 40 mg	Prednisolon p.o. 20 mg
Tag 9-11	Prednisolon p.o. 30 mg	Prednisolon p.o. 20 mg
Tag 12-14	Prednisolon p.o. 20 mg	Prednisolon p.o. 20 mg
Tag 15-30	Prednisolon p.o. 10 mg	Prednisolon p.o. 15 mg
Tag 31-39	Prednisolon p.o. 7,5 mg	Prednisolon p.o. 10 mg
Tag 40-100	Prednisolon p.o. 7,5 mg	Prednisolon p.o. 4 mg

Fortsetzung Tabelle 3.3: Immunsuppression bei Lebendnierenspenden an den Universitätskliniken Leipzig und Halle/Saale, MMF = Mycophenolat-Mofetil, p.o. = per os, i.v. = intravenös

3.3 Versuche zur Etablierung des Elispot-Verfahrens

Die methodische Etablierung der Elispot-Assays für IFN- γ und IL-17 erforderte eine Reihe von Vorversuchen. Dabei sind folgende Parameter untersucht und modifiziert worden:

- 1) notwendige Zellkonzentration
- 2) Inkubationszeit
- 3) Bestrahlung
- 4) Stimulation

Für die Vorversuche wurden hauptsächlich Buffy Coats aus der Transfusionsmedizin der Universität Leipzig verwendet. Zusätzlich wurden Versuche mit Blut von freiwilligen Spendern durchgeführt. Ein Ethikvotum dafür lag vor.

3.3.1 Vorversuche zum Nachweis von IFN- γ

Zunächst wurden im Elispot-Verfahren Zellkonzentrationen (PBMC) zwischen $2,5 \times 10^5/\text{ml}$ und $3 \times 10^6/\text{ml}$ untersucht. Als optimal stellte sich bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden eine Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ heraus. Die ursprünglich als optimal veranschlagte Zellkonzentration von $5 \times 10^5/\text{ml}$ wurde nach Beginn der Elispot-Versuche der 12 Spender-Empfänger-Paare verworfen (siehe 3.4). Tabelle 3.4 zeigt das Verhältnis der untersuchten Konzentrationen.

Zellkonzentrationen der Vorversuche im IFN- γ -Elispot

Zellkonzentration	$2,5 \times 10^5/\text{ml}$	$5 \times 10^5/\text{ml}$	$1 \times 10^6/\text{ml}$	$3 \times 10^6/\text{ml}$
Spots relativ (gerundet)	0,02	1	2,4	5,5
Spots absolut	1	67	157	368
Fallzahl	2	14	8	7

Tab. 3.4 verschiedene Zellkonzentrationen und deren Spotanzahl pro Napf im IFN- γ -Elispot

Die Inkubationszeit der PBMC zur Untersuchung einer geeigneten Spotanzahl im IFN- γ -Elispot wurde auf 48h festgelegt. Untersuchungen mit einer Inkubationszeit von 24h bzw. 72h ergaben für eine korrekte Auszählung zu geringe bzw. deutlich zu hohe Spotanzahlen (TNTC).

Ein Teil der Spender-PBMC wurde zunächst mit 30 Gy bestrahlt, bevor sie auf die Elispot-Platten aufgetragen wurden. Damit konnte sichergestellt werden, dass die Zytokinproduktion der Spender-PBMC so weit wie möglich reduziert wurde (siehe Tab. 3.5). Es konnte gezeigt werden, dass die PBMC trotz verringerter Zytokinausschüttung weiterhin vital blieben (siehe 3.3.4).

Bestrahlung in den Vorversuchen des IFN- γ -Elispot

Zellzahl		LW	LW (30 Gy)	LW (30 Gy) / LW
$5 \times 10^5/\text{ml}$	24h Ink.	67	12	0,18
	Fallzahl	14	7	-
$5 \times 10^5/\text{ml}$	48h Ink.	200	5,5	0,03
	Fallzahl	2	1	-
$1 \times 10^6/\text{ml}$	24h Ink.	157	11	0,07
	Fallzahl	8	3	-
$1 \times 10^6/\text{ml}$	48h Ink.	88	14	0,16
	Fallzahl	8	3	-

Tab 3.5: Vergleich der Spots an Leerwerten zu den Spots an bestrahlten Leerwerten und deren Quotient im IFN- γ -Elispot; LW= Leerwert; Ink = Inkubationszeit; Gy = Gray

Aufgrund der viel zu geringen Spotanzahlen bei den 12 Patientenpaaren im Vergleich zu den PBMC der Buffy Coats wurde die Verwendung von IL-2 als Wachstumsfaktor in die Methode generell integriert (siehe 3.4). Die Zugabe von IL-2 (25 IU/ml) erfolgte dabei erst nach 24h Inkubation. Tab 3.6 zeigt die Messwerte der Vorversuche.

IL-2-Konzentrationen in den Vorversuchen des IFN- γ -Elispot

24h Inkubation	LW	5 IU/ml	10 IU/ml	25 IU/ml
Spots absolut	67	100	170	189
Spots relativ	1	1,5	2,5	2,8
Fallzahl	14	6	4	6

Tab 3.6: Vergleich der stimulierten Spots zu den Spots an Leerwerten im IFN- γ -Elispot (Buffy Coats); LW=Leerwert, IU= international Units, Zellkonzentration der PBMC = 5×10^5 /ml

Weiter wurden die Spender- und Empfänger-PBMC gemeinsam in einer Lymphozytenmischreaktion (MLR) untersucht, um die Reaktion der Empfänger-PBMC auf die Spender-PBMC zu messen. Dabei wurden von der Spotanzahl aus der MLR die Spotanzahl der Empfänger-PBMC und der bereits bestrahlten Spender-PBMC subtrahiert (Tab 3.7).

Spotanzahlen der Vorversuche im IFN- γ -Elispot

24h Inkubation	Konzentration	Spots
LW (E)	5×10^5 /ml	67
LW (S)	5×10^5 /ml	12
MLR (A)	1×10^6 /ml	164
MLR (B)	1×10^6 /ml	85

Tab. 3.7: Darstellung der Spots aus den Vorversuchen des IFN- γ -Elispot-Assays (Durchschnitt); LW = Leerwert; E = Empfänger; S= Spender; MLR = Lymphozytenmischreaktion, MLR (A)= unbereinigter MLR; MLR (B) = bereinigter MLR

Im Endeffekt ergaben sich für den IFN- γ -Elispot folgende Parameter zur Assayoptimierung:

- Zellkonzentration (Leerwert): 1×10^6 /ml
- Zellkonzentration (MLR): 2×10^6 /ml
- Inkubationszeit: 48 h
- Bestrahlung: 30 Gy
- Stimulation: IL-2 (25 IU/ml; t = 24h)

3.3.2 Vorversuche zum Nachweis von IL-17

Zunächst erfolgte für den IL-17-Elispot die Stimulationseinstellung mit OKT3. Dabei wurde eine OKT3-Konzentration von 0,05 µg/ml festgelegt (Tab 3.8). Spotanzahlen (>8) ohne Stimulanz waren nicht messbar. Die Inkubationszeit wurde im Vergleich zum IFN-γ-Elispot auf 48h ausgeweitet. Gleichzeitig wurde die Zellkonzentration auf 5x10⁵/ml halbiert (Tab. 3.9). Die Bestrahlung der PBMC wurde mit 30 Gy durchgeführt. Genauso wie beim IFN-γ-Elispot zeigte sich auch hier eine deutlich verringerte Spotanzahl (Tab 3.10).

Einstellung der Stimulanz im IL-17-Elispot

24h Inkubation	LW	LW+OKT3
Spots absolut	6	248
Spots relativ	1	41
Fallzahl	6	5

Tab. 3.8: Vergleich der Spots mit und ohne OKT3-Stimulation im IL-17-Elispot; LW=Leerwert, Zellkonzentration = 1x10⁶/ml

Einstellung der Zellkonzentration im IL-17-Elispot

Zellkonzentration	5x10 ⁵ /ml	1x10 ⁶ /ml	2x10 ⁶ /ml
Spots absolut	76	248	583
Spots relativ	1	3	8
Fallzahl	6	5	2

Tab. 3.9: Einsatz unterschiedlicher Zellkonzentrationen für den IL-17-Elispot; Inkubationszeit = 48h; mit OKT3-Stimulation

Bestrahlung in den Vorversuchen des IL-17-Elispot

Zellzahl		LW	LW (30 Gy)	LW (30 Gy) / LW
5x10 ⁵ /ml	Spots absolut	76	6	0,08
	Fallzahl	6	3	-
1x10 ⁶ /ml	Spots absolut	248	11	0,04
	Fallzahl	5	3	-

Tab. 3.10: Vergleich der bestrahlten zu den unbestrahlten PBMC im IL-17-Elispot; OKT3-Stimulation mit 0,05 µg/ml; Gy = Gray; LW = Leerwert

Im Vergleich zu den Leerwerten wurde für die Lymphozytenmischreaktion die doppelte Zellkonzentration verwendet (vgl. IFN-γ-Elispot). Auch bei der MLR von IL-17 wurde von der gezählten Spotanzahl die Spotanzahl der Empfänger-PBMC und der bereits bestrahlten Spender-PBMC subtrahiert. Es zeigte sich eine ausreichende Produktivität von IL-17 in den Näpfen (Tab. 3.11).

Spotanzahlen der Vorversuche im IL-17-Elispot

48h Ink.	Konzentration	Spots
LW (E)	5x10 ⁵ /ml	76
LW (S)	5x10 ⁵ /ml	6
MLR (A)	1x10 ⁶ /ml	107
MLR (B)	1x10 ⁶ /ml	25

Tab. 3.11: Darstellung der Spots aus den Vorversuchen des IL-17-Elispot-Assays (Durchschnitt); LW = Leerwert; E = Empfänger; S= Spender; MLR (A) = unbereinigte MLR; MLR(B) = bereinigte MLR; Ink. = Inkubationszeit, MLR = Lymphozytenmischreaktion

Eine Optimierung für den IL-17-Elispot ergab sich über folgende Parameter:

- Zellkonzentration (Leerwert): 5×10^5 /ml
- Zellkonzentration (MLR): 1×10^6 /ml
- Inkubationszeit: 48 h
- Bestrahlung: 30 Gy
- Stimulation: OKT3 (0,05 μ g/ml; t = 48h)

3.3.3 Versuche mit FKS-freiem Medium

Bei der Verwendung von Fetalem Kälberserum (FKS) besteht aufgrund der Variabilität in der Zusammensetzung unterschiedlichster Seren die Gefahr von Messschwankungen. Zudem wird FKS unter ethisch bedenklichen Bedingungen gewonnen (122). Daher wurde die Möglichkeit der Verwendung von FKS-freiem Medium für das IFN- γ -Elispot-Verfahren untersucht.

Als Medium wurde das serumfreie X-Vivo 15 (Lonza Ltd.) bzw. das Serum eines freiwilligen Probanden (RPMI + 5% Probandenserum) verwendet.

Im Elispot-Assay wiesen die Näpfe bei beiden FKS-freien Varianten nach 48h Inkubation in den PBMC-Konzentrationen 5×10^5 /ml und 1×10^6 /ml keine Auffälligkeiten auf. Dagegen zeigten sich bei einer PBMC-Konzentration von 2×10^6 /ml sowohl unter Verwendung von X-Vivo 15 als auch unter Zusatz von Probandenserum große Verklumpungen, die auf DNA-Fragmente schließen ließen (Abb. 3.1). Da die notwendige Zellkonzentration von 2×10^6 /ml mit FKS freien Medien nicht funktionierte, wurde die Möglichkeit einer FKS-freien Methode für die Untersuchung von IFN- γ und IL-17 verworfen.

Vergleich unterschiedlicher Medien im IFN- γ -Elispot

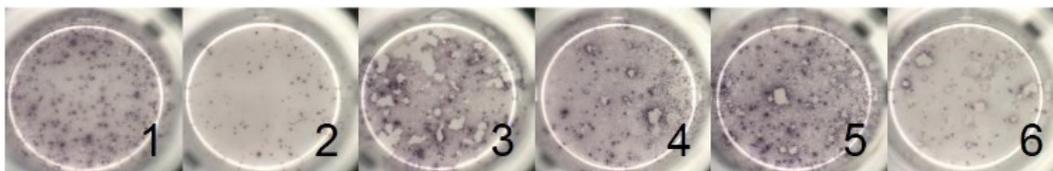


Abb. 3.1: Vergleich der unterschiedlichen Medien: 1) FKS unbestrahlt; 2) FKS bestrahlt; 3) Probandenserum unbestrahlt; 4) Probandenserum bestrahlt; 5) X-Vivo 15 unbestrahlt; 6) X-Vivo 15 bestrahlt; Zellkonzentrationen: 1-2: 1×10^6 /ml; 3-6: 2×10^6 /ml

3.3.4 Vitalitätsmessung in der Durchflusszytometrie

γ -Strahlung bewirkt in Zellen eine Schädigung zahlreicher Proteine, was bei hoher Strahlungsintensität zur Zellapoptose /-nekrose führen kann. Für die Überprüfung der Zellvitalität nach γ -Bestrahlung wurde eine Untersuchung am Durchflusszytometer durchgeführt. Dabei konnte mit Hilfe der Marker CD45-FITC und 7-AAD der Anteil toter Lymphozyten in zwei voneinander unabhängigen Proben untersucht werden.

Bestrahlte Proben wiesen einen Anteil von etwa 3% toter Lymphozyten auf, unbestrahlte Proben einen ähnlichen Anteil von etwa 2%. Auch bei den untersuchten PBMC zeigten sich keine großen Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Proben. Der Unterschied zwischen toten PBMC aus Buffy Coats und Patienten zeigte dagegen deutliche Differenzen (4-4,5% vs. 9-10%). Tab. 3.12 zeigt den Anteil toter PBMC und Lymphozyten mit bzw. ohne γ -Bestrahlung.

Für die weiteren Untersuchungen mit Hilfe des Elispot-Assays konnte der Anteil toter Patienten-PBMC von ca. 5% toleriert werden.

Einfluss der γ -Strahlung auf die Zellvitalität

Zelltyp	PBMC	PBMC	Lymphoyten	Lymphozyten
Bestrahlung	0 Gy	30 Gy	0 Gy	30 Gy
alle	7,5	8	2	3
Buffy Coats	9	10	2	3,5
Patienten	4,5	4	2,5	3

Tab 3.12: Anteil [%] der toten Zellen an den bestrahlten und unbestrahlten Proben; Gy=Gray

3.4 Vergleich von Buffy Coats mit Patientenproben im Elispot-Assay

Nach Etablierung der IFN- γ - und IL-17-Elispot-Assays wurde mit der Untersuchung der Patientenproben begonnen. Dabei zeigte sich eine große Diskrepanz zu den Spotanzahlen der Vorversuche. So wiesen bei einer Zellkonzentration von 5×10^5 /ml die PBMC der Buffy Coats im IFN- γ -Elispot eine durchschnittliche Spotanzahl von 102 auf. Die Auswertung der ersten beiden Empfänger und Spender (präoperativ und unbestrahlt) zeigte eine durchschnittliche Anzahl von 19 Spots, die durchschnittliche Anzahl aller 12 Empfänger ergab letztendlich 31 Spots. Daraufhin wurde, wie bereits in 3.2.1 beschrieben, für den IFN- γ -Elispot ab dem dritten Patientenpaar eine Stimulation mit IL-2 (25 IU/ml) wieder aufgenommen und die Zellkonzentration von 5×10^5 /ml auf 1×10^6 /ml erhöht. Die

ersten beiden Patientenpaare konnten daher nicht in die Statistiken des mit IL-2 stimulierten IFN- γ -Elispots aufgenommen werden.

Die Methode des IL-17-Elispot wurde bei vergleichbaren Spotanzahlen belassen.

Tab 3.13 zeigt die durchschnittlich Spotanzahl der Buffy Coats im Vergleich zu der durchschnittlichen Spotanzahl aller zwölf Empfänger (präoperativ und unbestrahlt).

Vergleich der Spotanzahlen von Empfänger und Buffy Coats

	Konzentration	A) Empfänger	B) Buffy Coats	Quotient A/B
IFN- γ (LW)	1x10 ⁶ /ml	31	88	0,35
IL-17 (+OKT3)	5x10 ⁵ /ml	147	76	1,9

Tab. 3.13: Vergleich der durchschnittlichen Spotanzahlen von Patienten und Buffy Coats (Vorversuche) im Elispot-Assay; Inkubationszeit 48h; LW = Leerwert; OKT3-Stimulation mit 0,05 μ g/ml

3.5 Elispot-Assays der Spender-Empfänger-Paare

Von ursprünglich 17 berücksichtigten Patientenpaaren wurden 12 Paare in die vorliegende Arbeit eingeschlossen. Das Messergebnis des letzten Patientenpaares konnten aufgrund eines laborinternen Fehlers nicht in die Auswertung mit einbezogen werden.

Pro Patientenpaar und Elispot-Methode wurden jeweils drei unterschiedliche Varianten für die Empfänger und die Lymphozytenmischreaktion (MLR) untersucht: unstimulierter Leerwert, Leerwert + IL-2 (IFN- γ) bzw. OKT3 (IL-17), und Leerwert + PHA (Positivkontrolle). Bei der Messung der Proben wurden die unterschiedlichen Zeitpunkte und die Bestrahlung der Spender-PBMC anhand von Buchstaben und Zahlen definiert. So wurde die MLR aus Spender- und Empfänger-PBMC vor Operation mit dem Buchstaben A, die drei postoperativen Werte mit den Buchstaben B-D angezeigt.

Erläuterung der Patientenkodierung

Empfänger	A	B	C	D
Tag	vor OP	21 (\pm 3)	28 (\pm 3)	75 (\pm 15)
MLR 1	A1	B1	C1	D1
Tag	vor OP	21 (\pm 3)	28 (\pm 3)	75 (\pm 15)
S bestrahlt	-	-	-	-
MLR 2	A2	B2	C2	D2
Tag	vor OP	21 (\pm 3)	28 (\pm 3)	75 (\pm 15)
S bestrahlt	+	+	+	+

Tab 3.14: Erläuterung der Abkürzungen für die Proben der Empfänger sowie der Proben der MLR, bestehend aus Empfänger und Spender; MLR = Lymphozytenmischreaktion, S = Spender

Die MLR mit den unbestrahlten Spender-PBMC werden mit der Zahl 1, die MLR mit den bestrahlten Spender-PBMC mit der Zahl 2 gekennzeichnet. Einen Überblick bietet Tab. 3.14.

3.5.1 Ergebnisse der Elispot-Assays zum Nachweis von IFN- γ

Zunächst wurden die Spots der Spender (=S) und Empfänger (=E) vor Operation verglichen. Dabei lagen die Spots der Empfänger und Spender im Leerwert (E: Median 23; Messbereich 15-36 | S: Median 18; Messbereich 5-93) als auch unter IL-2-Stimulation (E: Median 51; Messbereich 16-255 | S: Median 53; Messbereich 3-137) ähnlich hoch (Abb. 3.2/3.3).

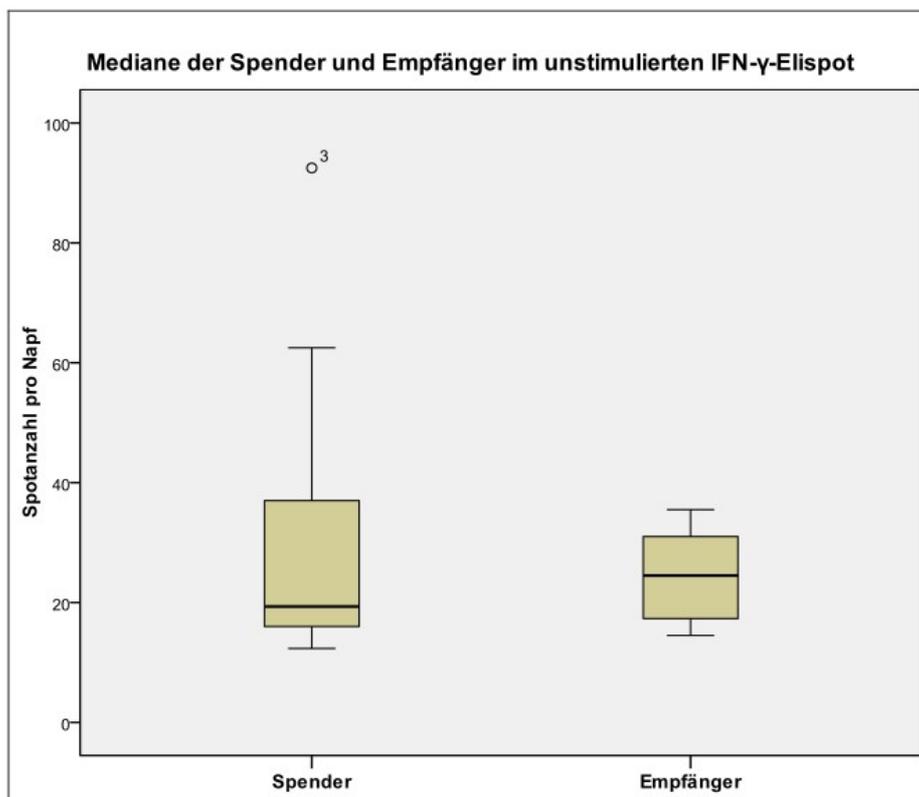


Abb. 3.2: Mediane der Spender- und Empfänger-PBMC im unstimulierten IFN- γ -Elispot; 3 = Patientenpaar Nummer 3

Bei den Spender-PBMC zeigte sich in den Leerwerten eine leicht höherer Spotanzahl der unbestrahlten Proben (Median 20; Messbereich 5-93) im Vergleich zu den bestrahlten Proben (Median 15; Messbereich 2-38) (Abb. 3.4), Der Wilcoxon-Test zeigte einen signifikanten Unterschied von $p = 0,047$.

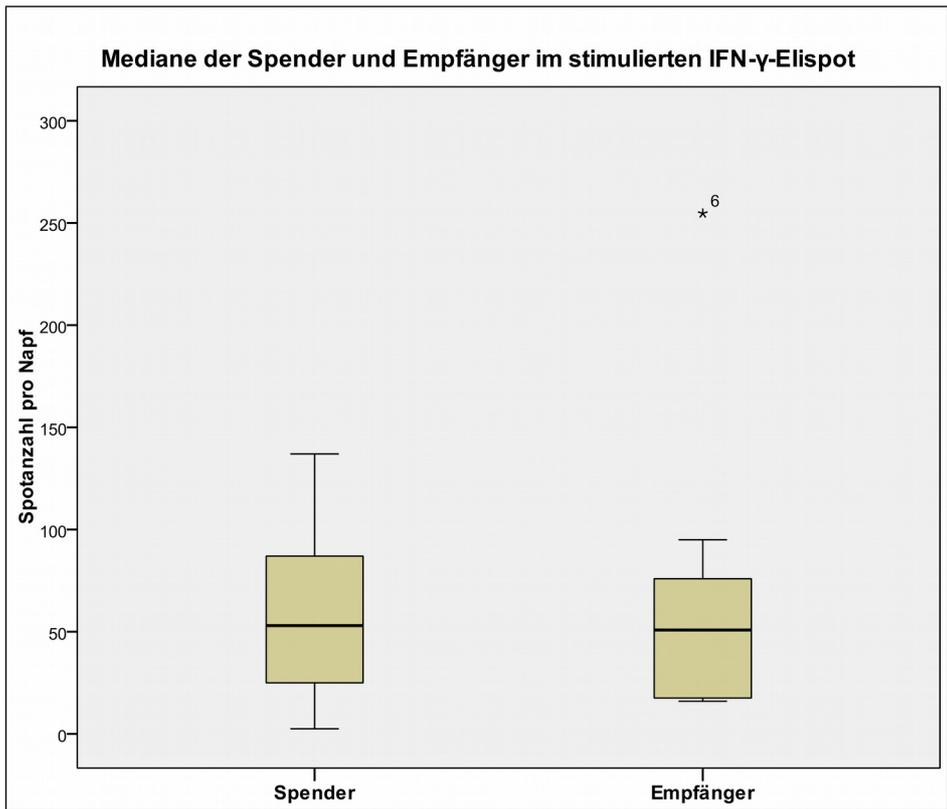


Abb. 3.3: Mediane der Spender- und Empfänger-PBMC im stimulierten IFN- γ -Elisot; 6 = Patientenpaar Nr. 6

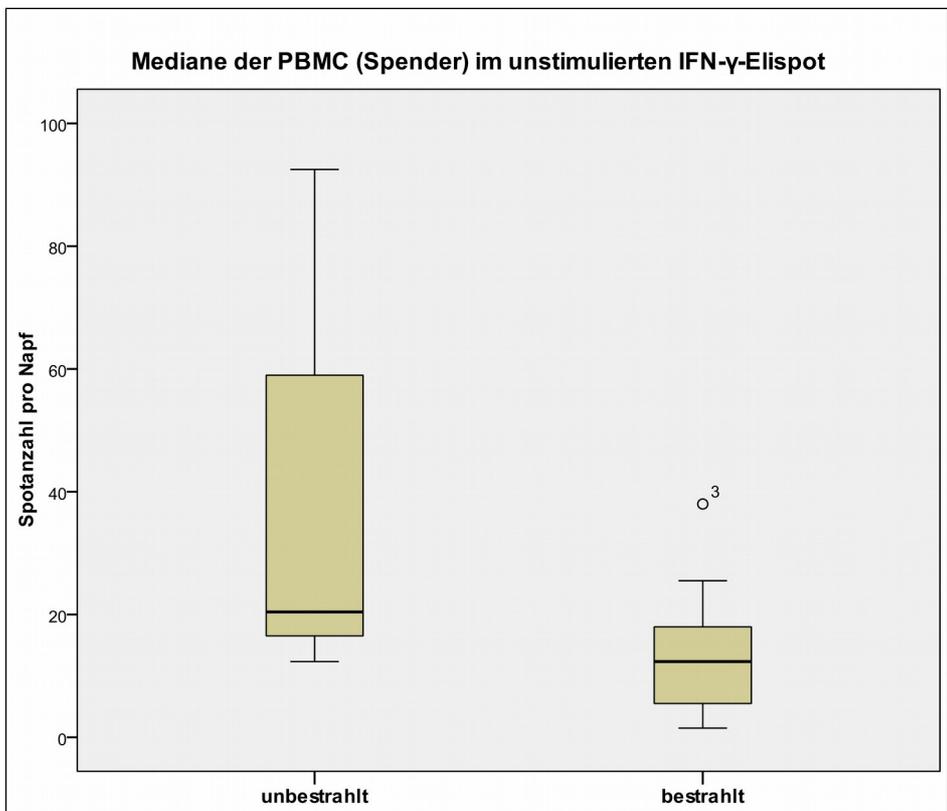


Abb. 3.4: Mediane der bestrahlten und unbestrahlten PBMC der Spender im unstimulierten IFN- γ -Elisot; 3 = Patientenpaar Nr.3

Deutlicher zeigte sich der Unterschied dabei unter IL-2-Stimulation. Hier waren die Spotanzahlen der unbestrahlten Spender-PBMC (Median 53; Messbereich 3-137) im Vergleich zu den Proben der bestrahlten Spender-PBMC (Median 9; Messbereich 5-30) deutlich größer (Abb. 3.5). Auch hier zeigte sich im Wilcoxon-Test ein signifikanter Unterschied ($p = 0,007$).

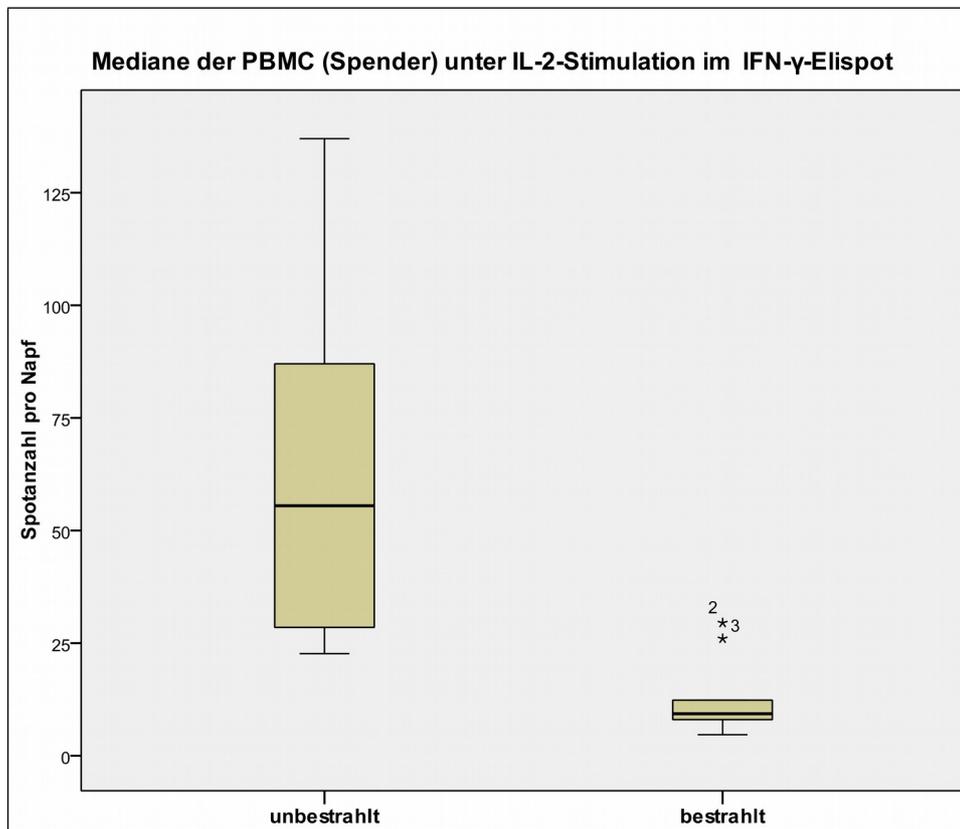


Abb. 3.5: Mediane der unbestrahlten und bestrahlten PBMC der Spender unter IL-2 Stimulation im IFN- γ -Elisot; 2 bzw. 3 = Patientenpaar 2 bzw. 3

Bei den Empfängern wurden die vier unterschiedlichen Zeitpunkte der Blutentnahmen miteinander verglichen (Abb. 3.6). Die größte Spotanzahl wurde sowohl im unstimulierten Leerwert (Median 24; Messbereich 15-36) als auch unter IL-2-Stimulation (Median 51; Messbereich 16-255) zum Zeitpunkt A (vor Operation) gemessen. Postoperativ war kein eindeutiger Trend zu beobachten. Bei den unstimulierten Leerwerten wurde zum Zeitpunkt D die höchste postoperative Spotanzahl gemessen (Median 23; Messbereich 6-47). Dagegen wurde bei den mit IL-2 stimulierten Proben die höchste Spotanzahl zum Zeitpunkten C gemessen (Median 36; Messbereich 10-55).

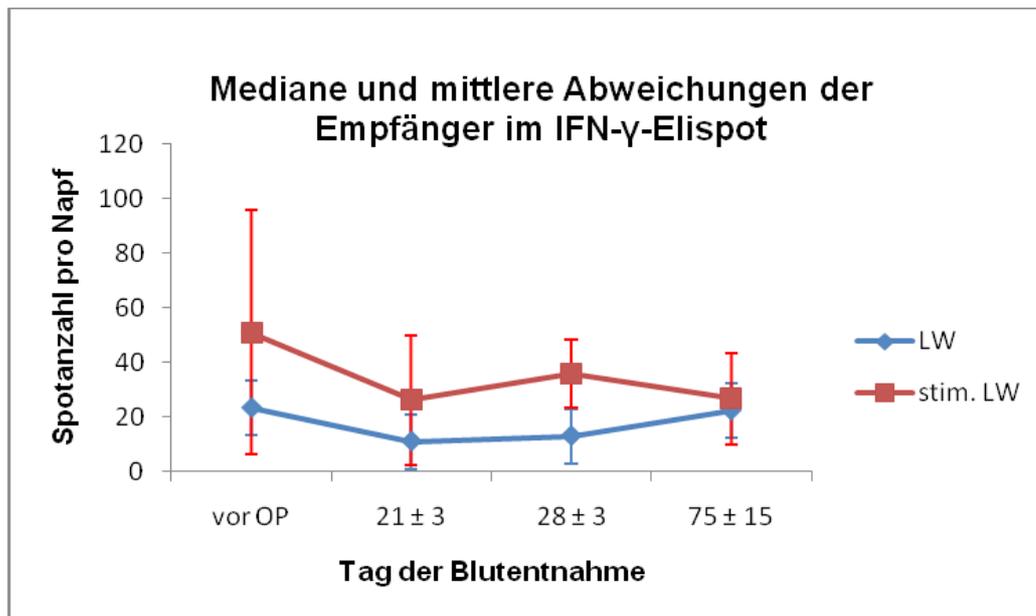


Abb. 3.6: Spotanzahlen der unstimulierten und stimulierten IFN- γ -Elispots der Empfänger-PBMC pro Napf; LW = Leerwert; stim. LW = stimulierter Leerwert

Bei den MLR mit unbestrahlten Spender- und Empfänger-PBMC zeigte sich zum Zeitpunkt A1 im Leerwert ein Median von 151 (Messbereich 23-354). Alle Mediane der postoperativen Zeitpunkte B1-D1 waren niedriger. Dabei unterschieden sich die postoperativen Spots nur gering (Mediane: B1: 72; Messbereich 4-105 | C1: 55; Messbereich 7-177 | D1: 58; Messbereich 12-193).

Unter IL-2-Stimulation wurden vergleichbar hohe Spotanzahlen für die Zeitpunkte A1 und D1 gemessen (Mediane A1: 154; Messbereich 76-312 | D1: 143; Messbereich 101-211). Die Spotanzahlen bei den Zeitpunkten B1 und C1 lagen deutlich darunter (Mediane: B1: 115; Messbereich 42-255 | C1: 108; Messbereich 50-228) (Abb. 3.7).

Sowohl bei den Leerwerten als auch bei den IL-2-stimulierten Proben zeigte sich die geringste Spotanzahl zum Zeitpunkt C1, also vier Wochen nach Transplantation (Mediane: LW: 55 | LW+IL-2: 108).

Bei den MLR der bestrahlten Spender-PBMC mit den Empfänger-PBMC ergaben sich zwischen den Leerwerten und den mit IL-2-stimulierten Proben unterschiedliche Verläufe. In den Leerwerten zeigte sich ein deutlicher Spotunterschied zwischen dem präoperativen (A2: Median 75; Messbereich 14-318) und den drei postoperativen Werten (Mediane: B2: 35; Messbereich -73-71 | C2: 40; Messbereich 1-98) | D2: Median 56; Messbereich 7-103). Dabei wurden drei Wochen postoperativ (B2) die wenigsten Spots, und 60-90 Tagen postoperativ (D2) die meisten Spots gemessen (Abb. 3.8).

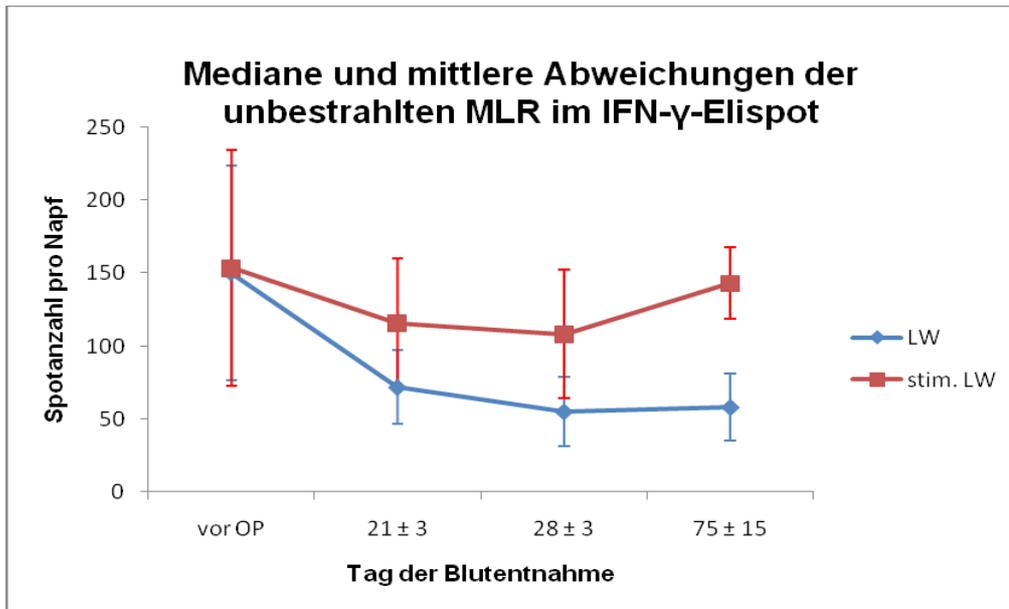


Abb. 3.7: Mediane und mittlere Abweichungen der MLR mit unbestrahlten Spender-PBMC im IFN-γ-Elispot; MLR = Lymphozytenmischreaktion; LW = Leerwert; stim. LW = stimulierter Leerwert

Unter IL-2-Stimulation zeigte sich keine große Diskrepanz zwischen den präoperativen (Median: A2: 83; Messbereich -2-377) und den postoperativen Spotanzahlen (Mediane: B2: 47; Messbereich 7-162 | C2: 85; Messbereich 16-163 | D2: 82; Messbereich: 37-125). Lediglich Zeitpunkt B2 wies erniedrigte Spotanzahlen auf. Die höchste Spotanzahl zeigte sich entgegengesetzt zu den unstimulierten Messungen vier Wochen nach Transplantation (Abb. 3.8).

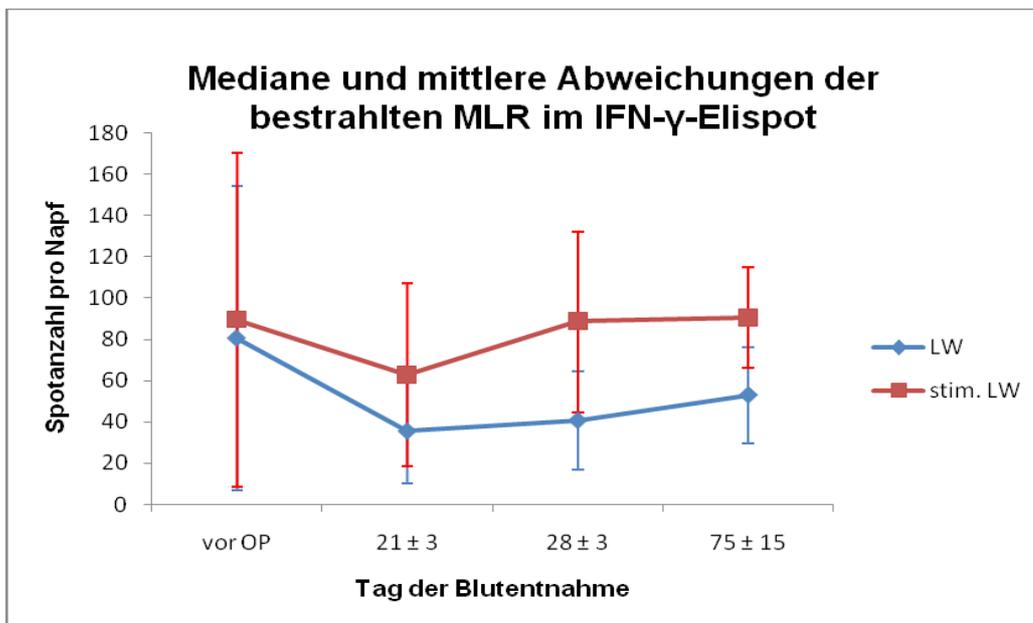


Abb. 3.8: Mediane und mittlere Abweichungen der MLR mit bestrahlten Spender-PBMC im IFN-γ-Elispot; MLR = Lymphozytenmischreaktion; LW = Leerwert; stim. LW = stimulierter Leerwert

Um eine Abhängigkeit der vier zeitlich voneinander getrennten Spotanzahlen A2-D2 zu prüfen, wurde der Friedman-Test für k verbundene Stichproben durchgeführt. Weder für die Leerwertspots noch für die IL-2-stimulierten Spots konnte eine Signifikanz ($p_{LW}=0,315$ bzw. $p_{IL-2}=0,157$) erreicht werden.

3.5.2 Ergebnisse der Elispot-Assays zum Nachweis von IL-17

Aufgrund der zu geringen Spotanzahlen konnten im IL-17-Elispot-Assay die unstimulierten Proben untereinander nicht verglichen werden. Die Messbereiche der Spender- und Empfänger-PBMC lagen bei 0-6 Spots pro Napf, die der MLR bei 0-30 Spots pro Napf, wobei kein Median größer als 4 war.

Bei den mit OKT3-stimulierten Proben zeigten sich ähnliche Spotanzahlen bei den PBMC der unbestrahlten Spender (Median 145; Messbereich 26-239) und den PBMC der Empfänger zum Zeitpunkt A (Median 141; Messbereich 9-216) (Abb. 3.9)

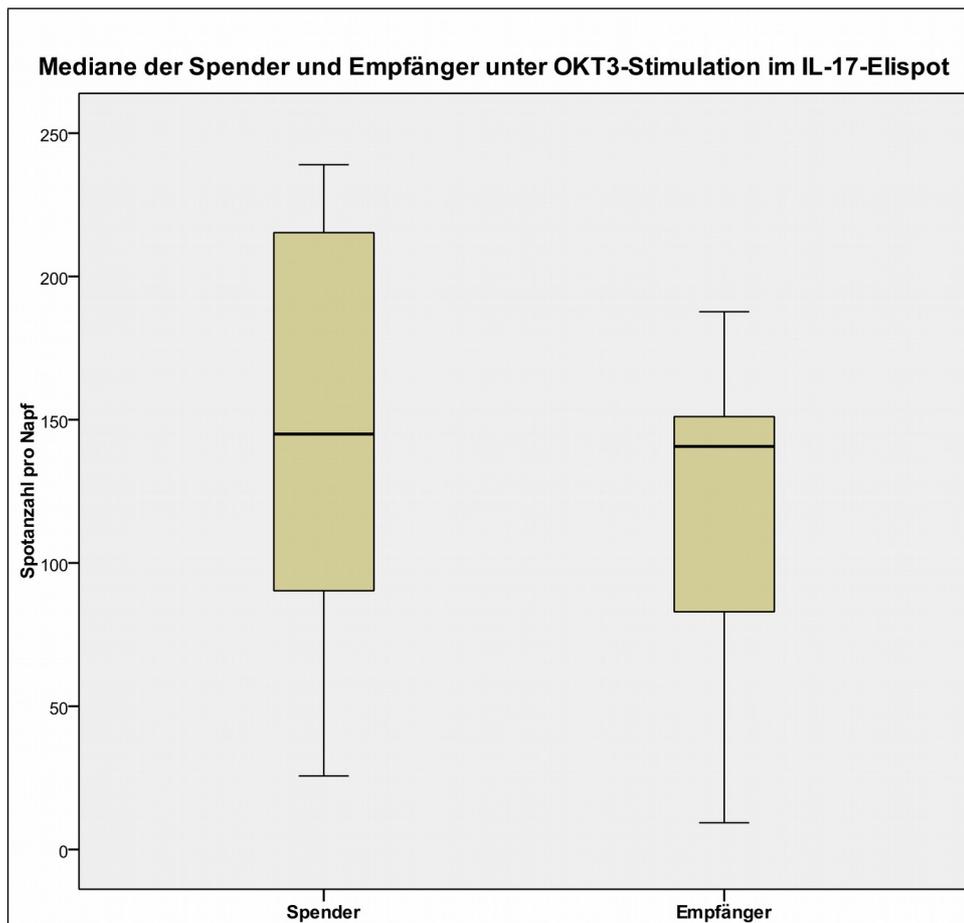


Abb. 3.9: Mediane der Spender- und Empfänger-PBMC unter OKT3-Stimulation im IL-17-Elispot

Zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Spender-PBMC war eine große Diskrepanz zu messen. Bei den bestrahlten Proben (Median 19; Messbereich 1-42) entsprach die Anzahl der gemessenen Spots nur 13% der unbestrahlten Proben (Median 145; Messbereich 26-239) (Abb. 3.10). Der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben zeigte hier einen signifikanten Unterschied von $p=0,001$.

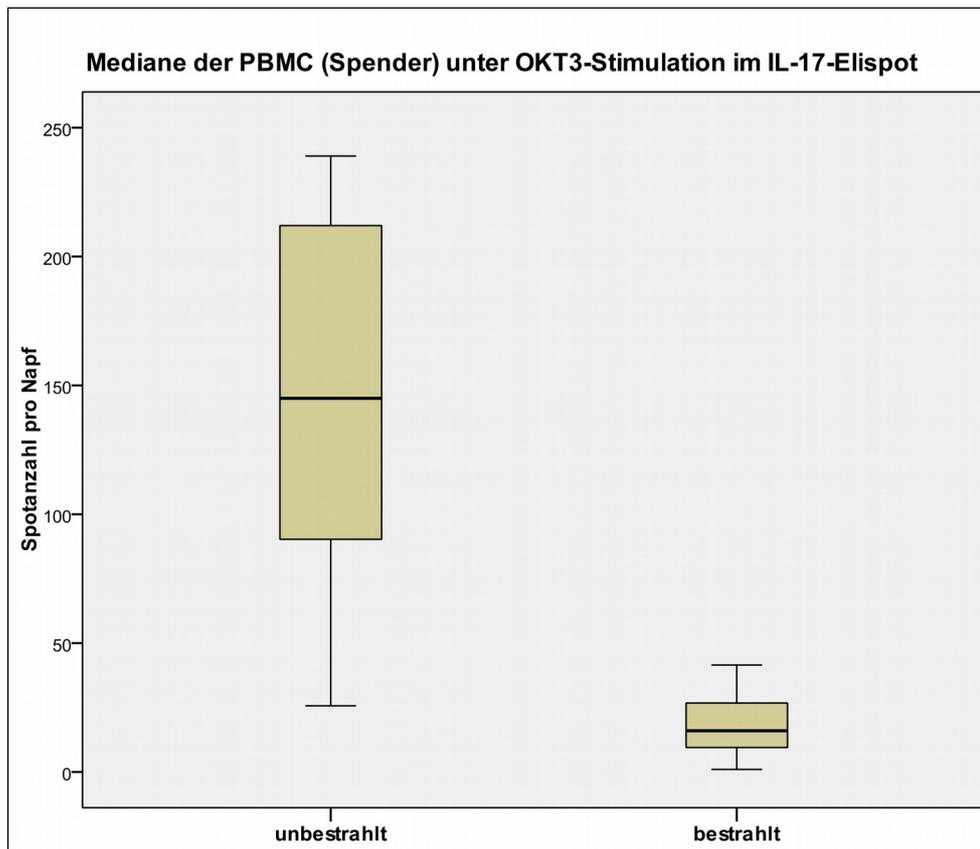


Abb. 3.10: Mediane der unbestrahlten und bestrahlten Spender-PBMC im IL-17-Elispot

Die vier Proben der Empfänger (Zeitpunkte A-D) hatten ihre höchste Spotanzahl zum Zeitpunkt A (Median 141; Messbereich 9-216). Alle Mediane der postoperativ gemessenen Spots lagen darunter (B: Median 87; Messbereich 40-273 | C: Median 138; Messbereich 17-318 | D: Median 137; Messbereich 43-244) (Abb. 3.11).

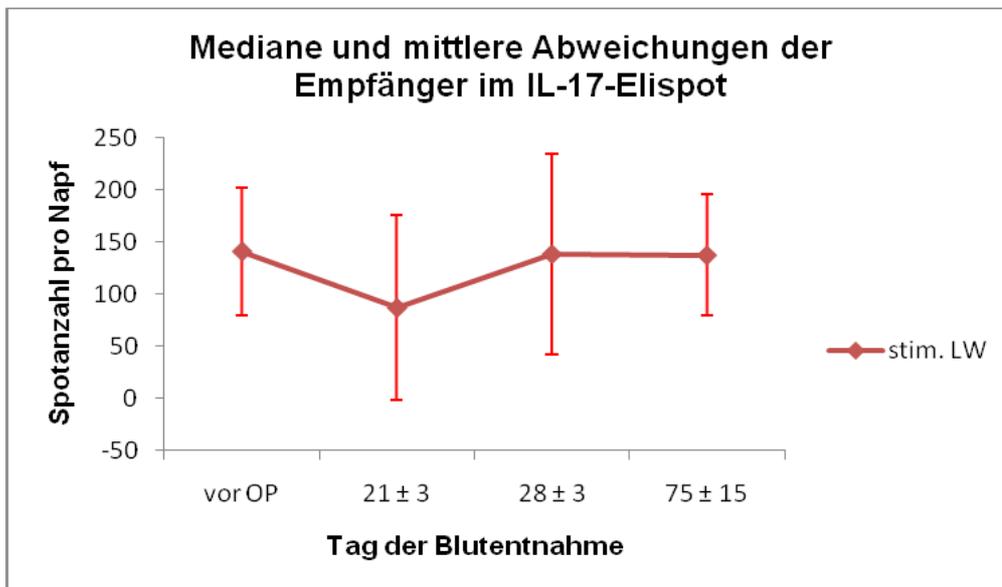


Abb. 3.11: Spotanzahlen der der mit OKT3 stimulierten IL-17-Elispots der Empfänger-PBMC im Verlauf; stim. LW = stimulierter Leerwert

In den MLR des IL-17-Elispot-Assays der unbestrahlten Proben ergaben sich unter OKT3-Stimulation nach Bereinigung der Werte ausnahmslos negative Mediane. Dabei wurde der niedrigste Wert zum Zeitpunkt D1 gemessen (Median -82; Messbereich -159-81). Der Verlauf der Spotanzahlen zeigte nach dem präoperativen Wert A1 (Median -20; Messbereich -177-63) postoperativ zunächst eine Zunahme (B1: Median -5; Messbereich -215-44), fiel aber bereits nach vier Wochen unter den Anfangswert ab (C1: Median -58; Messbereich -226-89) (Abb. 3.12).

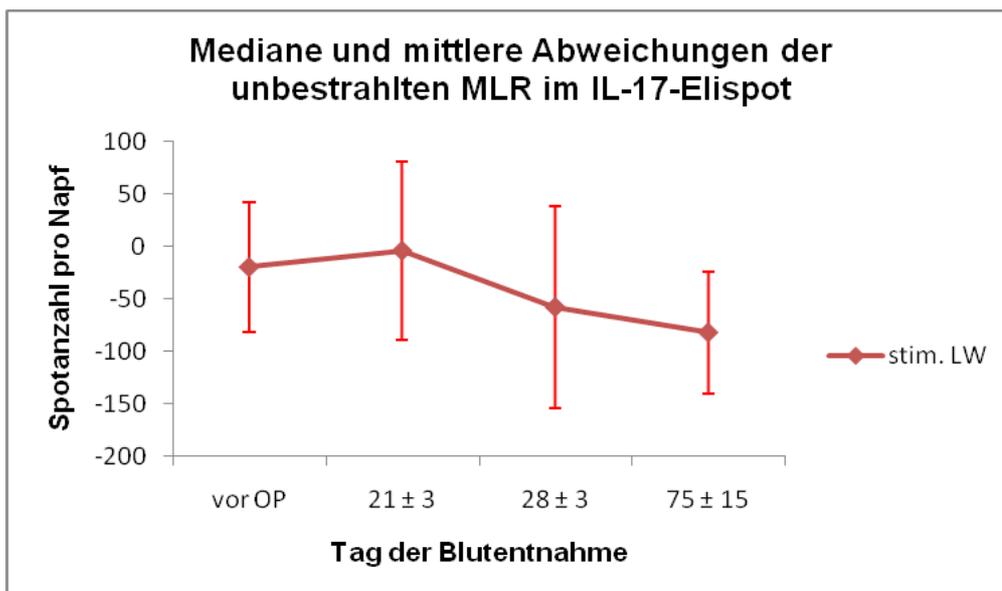


Abb. 3.12: Mediane und mittlere Abweichungen der MLR mit unbestrahlten Spender-PBMC im IL-17-Elispot; MLR = Lymphozytenmischreaktion; stim. LW = stimulierter Leerwert

Dagegen konnten bei den MLR der bestrahlten Spender-PBMC mit den Empfängern wieder positive Mediane gemessen werden. Die präoperative MLR (A2: Median 37; Messbereich -28-97) zeigte deutlich größere Spotanzahlen als alle drei postoperativen MLR (B2-D2: durchschnittlicher Median: 10; Messbereich -123-81).

Der höchste postoperative Wert war zum Zeitpunkt D2 (Median 14; Messbereich -53-81). Zum Zeitpunkt B2 ergab der Median ein negativen Wert (B2: Median -7,5; Messbereich -78-59) (Abb. 3.13), der Median C2 lag dazwischen (C2: Median 4; Messbereich -123-73). Für die bestrahlten Proben A2-D2 des IL-17-Elispots wurde wie bereits im IFN- γ -Elispot der Friedman-Test für k verbundene Stichproben durchgeführt. Dabei zeigte sich auch hier keine Signifikanz, weder für die Leerwertespots ($p_{LW} = 1$) noch für die OKT3-stimulieren Spots ($p_{OKT3} = 0,206$).

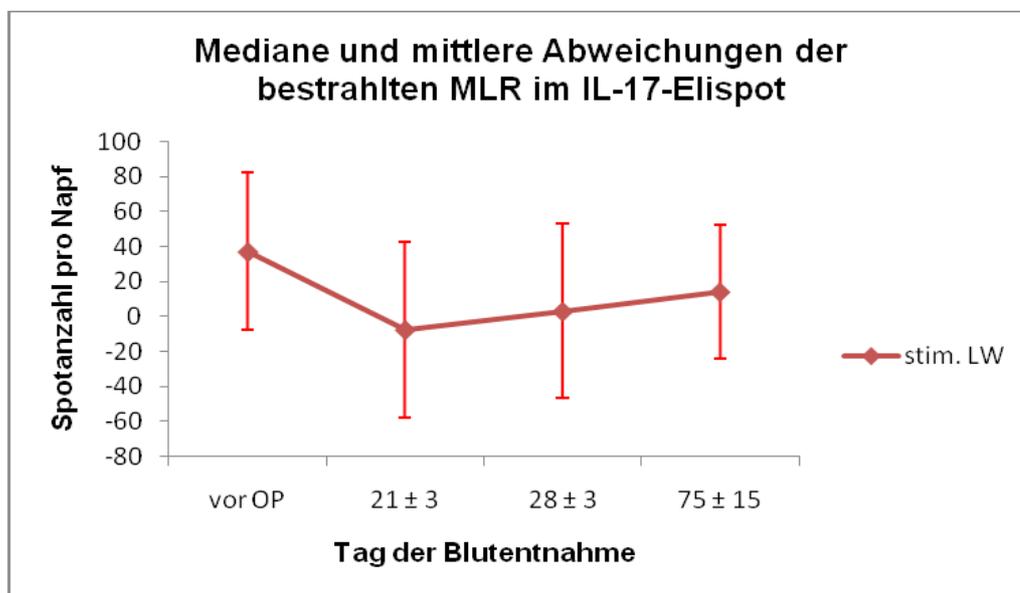


Abb. 3.13: Mediane und mittlere Abweichungen der MLR mit bestrahlten Spender-PBMC im IL-17-Elispot; MLR = Lymphozytenmischreaktion; stim. LW = stimulierter Leerwert

3.6 Elispot-Ergebnisse unter Berücksichtigung der HLA-Kompatibilität

Weiterhin wurden die Elispot-Assays der verschiedenen Patientenpaare genauer betrachtet. Dabei beinhaltet Gruppe 1 die Paare mit einem sogenannten HLA-Mismatch von 0-0-0 und 1-1-1 und Gruppe 2 die Paare mit einem Mismatch von 0-2-1, 1-1-2, 1-2-2 und 2-2-2. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beider Gruppen. Bei den unstimulierten und stimulierten IFN- γ -Elispot-Assays zeigten sich höhere Spotanzahlen zu den Zeitpunkten A2, C2 und D2 sowie niedrigere Spotanzahlen zum Zeitpunkt B2. Bei den stimulierten IL-17-Elispot-Assays wurden zu allen Zeitpunkten mehr Spots in Gruppe 1 gemessen. Einen Überblick bietet Tab. 3.15.

Unterschiede der Spotanzahlen in Bezug auf das HLA-Mismatch

	MLR A2	MLR B2	MLR C2	MLR D2
IFN-γ (LW)				
Gruppe 1	71	49	40	46
Gruppe 2	94	20	65	93
IFN-γ + IL-2				
Gruppe 1	54	78	65	74
Gruppe 2	83	36	85	117
IL-17 + OKT3				
Gruppe 1	41	-1	14	26
Gruppe 2	23	-5	-33	-7

Tab. 3.15: Darstellung der Mediane der verschiedenen Elispot-Assays im Bezug auf den HLA-Mismatch. Gruppe 1 stellt die Ergebnisse der Paare mit einem HLA-Mismatch von 0-0-0 und 1-1-1 dar, Gruppe 2 stellt die Ergebnisse der Paare mit einem HLA-Mismatch von 0-2-1, 1-1-2, 1-2-2 und 2-2-2 dar, A2-D2 markieren die Zeitpunkte (vgl. Tab 3.14), MLR = Lymphozytenmischreaktion

4 Diskussion

Die Überlebenswahrscheinlichkeit eines transplantierten Organs hängt zum großen Teil von der postoperativen Immunreaktion des Empfängers ab. Dabei wird versucht, eine Abstoßungsreaktion gegen die implantierte Niere durch eine abgestimmte Kombination von Immunsuppressiva zu verhindern. Immunsuppressiva beinhalten jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen, die für den Erhalt der Nierenfunktion in Kauf genommen werden müssen. Grundsätzlich stellt sich deshalb die Frage, inwieweit man durch Erfassen des individuellen körpereigenen Immunstatus eines Nierenempfängers (Immunmonitoring) eine individualisierte Reduzierung der Immunsuppressiva und deren Nebenwirkungen erreichen kann. In diesem Zusammenhang wurde die Möglichkeit geprüft, ein Testverfahren für ein Immunmonitoring bei Empfängern von Lebendnierenspenden zu etablieren.

Mit folgenden Fragestellungen befasst sich folglich die vorliegende Arbeit:

- 1) Kann ein Elispot-Verfahren für IFN- γ und IL-17 etabliert werden?
- 2) Kann mit Hilfe des IFN- γ - und/oder IL-17-Elispot-Verfahrens präoperativ eine Abschätzung über die Annahmewahrscheinlichkeit einer transplantierten Niere getroffen werden?
- 3) Kann mit Hilfe des IFN- γ - und/oder IL-17-Elispot-Verfahrens prospektiv eine Abstoßungsreaktion der implantierten Niere festgestellt werden?

Die Patientenpaare von Lebendnierenspenden wurden in den Universitätskliniken Leipzig und Halle/Saale akquiriert. Den Paaren wurde dabei zu vier definierten Zeitpunkten (vgl. 2.1) in einer Zeitspanne von drei Monaten (präoperativ bis 90 Tage postoperativ) Blut entnommen. Die von dem Blut isolierten PBMC der Spender und Empfänger wurden sowohl separat als auch zusammen in einer Lymphozytenmischreaktion im Elispot-Verfahren auf die Expression der beiden Zytokine IFN- γ und IL-17 untersucht, wobei diese beiden proinflammatorischen Zytokine als diagnostische Parameter einer Abstoßungsreaktion dienen sollten. Neben den Elispot-Untersuchungen wurde der Verlauf der Serumkreatininmolarität sowie die HLA-Kompatibilität der Paare untersucht, um mögliche Rückschlüsse dieser Parameter auf die Ergebnisse der Elispot-Untersuchungen zu prüfen.

4.1 Bewertung der Methoden

4.1.1 Patientenauswahl und -akquirierung

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Grundreaktivität der Empfänger-PBMC auch die Zytokinausschüttung in einer Lymphozytenmischreaktion der Spender-PBMC mit den Empfänger-PBMC untersucht. Kadaverspenden konnten daher nicht in die Studie eingeschlossen werden. Die Untersuchung war auf die Zahl an Lebendnierenspenden aus den Universitätskliniken in Leipzig (2009-2012) und Halle/Saale (2012) begrenzt. Die medikamentöser Therapieschemata beider Kliniken waren vergleichbar (vgl. Tab. 3.2). Es ergab sich eine hohe Anzahl an Studienabbruchern von ca. 30 % (5/17), bedingt durch organisatorische Schwierigkeiten (Nachbetreuung der Patienten nicht vor Ort) und psychische Belastungsgrenzen (Studie als zusätzliche Belastung). Aufgrund der niedrigen Anzahl an Studienteilnehmer war es schwierig, signifikante Ergebnisse zu erzielen. Zahlreiche Studien über Lebendnierenspenden belegen die Schwierigkeit einer ausreichenden Patientenzahl (123,124).

Aufgrund der geringen jährlichen Zahl an Lebendnierentransplantationen ist es erstrebenswert, weitere Studien mit einer größeren Fallzahl und einem längeren Untersuchungszeitraum durchzuführen. Auch die Einbeziehung weiterer Transplantationszentren in der Umgebung wie z.B. Dresden, Jena oder Chemnitz könnte eine größere Fallzahl generieren.

Die Ausdehnung des Untersuchungszeitraums müsste durch eine Forschungsgruppe bewerkstelligt werden, die über mehrere Jahre eine höhere Fallzahl erreichen könnte. Möglich wäre auch der Versuch einer Metaanalyse, die alle bisherigen Studien zur Untersuchung der Toleranzentwicklung bei Nierentransplantationen anhand des Elispot-Verfahrens miteinbezieht.

4.1.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist heutzutage eine der tragenden Säulen bei der Untersuchung von Zellpopulationen. Dennoch ist sie durch die hohe Zahl an erforderlichen Zellen aus frischen Proben limitiert (125).

In der vorliegenden Arbeit war die Anzahl an verfügbarer PBMC sehr begrenzt. So konnte

die Durchflusszytometrie nur für die Untersuchung der Zellvitalität nach Bestrahlung herangezogen werden. Hier zeigten sich nur marginale Unterschiede zwischen der Anzahl toter PBMC nach Bestrahlung und toter PBMC ohne Bestrahlung (siehe 4.2).

In der Literatur sind keine Angaben über die Vitalität bei PBMC nach einer Bestrahlungsstärke von 30 Gy bekannt. Lediglich Heeger et. al untersuchten nachweislich bestrahlte Zellen mikroskopisch auf Vitalität, ohne jedoch die Überlebensrate darzustellen (126). Bei Studien über die Toleranzentwicklung nach Nierentransplantationen konnten keine Angaben zur Überprüfung der Vitalität nach Bestrahlung gefunden werden (20,127–129).

4.1.3 Elispot-Assay

Die Methode des IFN- γ -Elispot-Assays wird, wie bereits im Kapitel 2.3.9 beschrieben, als standardisierte Untersuchung zahlreicher Verfahren wie der Tuberkulose- und Impfdiagnostik angewandt (109). Dagegen gibt es noch keine diagnostisch etablierte Methode zur Anwendung eines IL-17-Elispot-Assays. Dieser ist zur Zeit noch Gegenstand unterschiedlicher Forschungsansätze (130–132).

Generell weisen Ergebnisse einer Elispot-Methode sowohl innerhalb eines Labors als auch zwischen verschiedenen Laboren erhebliche Unterschiede auf. Die Elispot-Methode ergibt bei der Detektion von einzelnen Tumorzellen zwar eine hohe Sensitivität und Spezifität, variiert bei größeren Spotanzahlen aber um bis zu 20% (128). Zhang und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Reproduzierbarkeit des Elispot-Assays in unterschiedlichen Laboren zu erreichen ist, solange die gleichen Methoden und Materialien verwendet werden. Dabei spielt die Anwendung eines serumfreien Mediums eine große Rolle (133).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen allesamt von ein und demselben Untersucher getätigt. Zudem wurden in den Versuchen die gleichen Materialien verwendet. Ein Testverfahren mit serumfreiem Medium konnte jedoch nicht etabliert werden (vgl. 3.3.3).

Die Methodik der beiden Elispot-Assays wurde auf viele verschiedene Varianten hin überprüft und kann als etabliert bezeichnet werden.

Erstrebenswert wäre eine Weiterentwicklung dieser Arbeit. So könnte die Anzahl der Blutentnahmen erhöht werden, womit eine größere Zellzahl erreicht werden könnte. Dies würde z.B. eine Ausweitung der Untersuchungen am Durchflusszytometer ermöglichen.

Die Unterscheidung der einzelnen T_H-Subpopulationen könnte dabei Rückschlüsse auf die Ausschüttung verschiedener Zytokine und damit auf die Immunantwort des Organismus zulassen.

4.2 Vitalitätsmessung

Um die Reaktivität der Spender-PBMC soweit wie möglich zu reduzieren, wurden sie vor Durchführung der Elispot-Assays bestrahlt. Dabei war darauf zu achten, dass die Zellen einerseits eine möglichst geringe Eigenproduktion der zu untersuchenden Zytokine IFN- γ und IL-17 aufwiesen, andererseits jedoch weiterhin vital blieben, um als Antigene auf die PBMC der Empfänger zu fungieren. Als Bestrahlungsintensität der γ -Strahlung wurden 30 Gray gewählt, wie bei Nickel und Mitarbeitern bereits beschrieben (127). Heeger und Mitarbeiter ließen die zu untersuchenden PBMC mit 40 Gy bestrahlen, wobei auch hier keine klare Angabe zur Überlebensrate gemacht wurde (126). Lediglich in einer Arbeit von Conrad und Mitarbeitern wurde die Vitalität vor und nach Bestrahlung mit Carbonionen und Röntgenstrahlen quantifiziert. Hier zeigte sich eine deutliche Abnahme der Zahl an vitalen Lymphozyten (134). Arbeiten, die sich mit onkologischer Bestrahlung beschäftigen, weisen dagegen deutlich niedrigere und damit nicht vergleichbare Strahlendosen auf (135,136).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine sehr geringe Abnahme an vitalen PBMC festgestellt. Bestrahlte Proben enthielten 0,5% (absolut) weniger vitale PBMC als unbestrahlte PBMC (siehe Tab 3.12). Hier bedarf es weitere Untersuchungen, um eine eindeutige Aussage über den Einfluss der Bestrahlung auf das Überleben der PBMC treffen zu können.

4.3 Elispot-Ergebnisse

4.3.1 Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten Elispot-Assays

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die γ -Bestrahlung der Spender-PBMC eine signifikante Reduktion der Zytokinproduktion nachgewiesen werden. Dadurch war es möglich, in der Lymphozytenmischreaktion die Zytokinausschüttung der Empfänger-PBMC separat darzustellen und gleichzeitig die Spender-PBMC als Antigene praktisch ohne eigene Zytokinausschüttung zu erhalten (siehe Tab. 3.4 und 3.10).

Sowohl bei den unstimulierten und stimulierten IFN- γ -Elispot-Assays, als auch bei den stimulierten IL-17-Elispot-Assays zeigte sich trotz geringer Stückzahl ein signifikanter Unterschied zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Elispot-Assays im Wilcoxon-Test. (IFN- γ -Elispot: LW: $p=0,047$; LW+IL-2: $p=0,011$ | IL-17-Elispot: LW+OKT3: $p=0,001$). Die Elispot-Assays der unstimulierten IL-17-Elispot-Assays konnten aufgrund geringer Spotanzahlen nicht in die Bewertung mit aufgenommen werden. Für die Spender-PBMC war ein Überleben bis 72 h nach Bestrahlung gegeben. Es bleibt festzuhalten, dass eine Bestrahlung der Spender-PBMC von 30 Gy geeignet ist, die Vitalität der PBMC zu erhalten und dabei die Zytokinausschüttung dieser auf ein Minimum zu reduzieren.

4.3.2 Elispot-Assays der Patienten

4.3.2.1 IFN- γ -Elispot-Assay

IFN- γ stellt das Hauptzytokin für die proinflammatorische Antwort des Körpers dar. Über T_{H1} -Lymphozyten werden zahlreiche Abwehrfunktionen des Körpers ausgelöst. Am wichtigsten dabei gilt die Aktivierung der Makrophagen. Eine gesteigerte Produktion von IFN- γ bedeutet eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Immunreaktion auf körperfremde Antigene und damit auf transplantierte Organe wie z.B. der Niere.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei den IFN- γ -Elispot-Assays der Empfänger-PBMC und bei den MLR mit den bestrahlten Spender-PBMC ähnliche Verläufe. So waren die Anzahl der Spots vor Transplantation stets am größten mit Ausnahme der Lymphozytenmischkultur der mit IL-2 stimulierter MLR, bei der es ähnlich hohe Werte zu den Zeitpunkten A2, C2 und D2 ergab (Abb. 4.1). Postoperativ konnte in allen Elispot-Assays ein Anstieg der Spotzahlen vom Zeitpunkt B (Tag 21 ± 3) zum Zeitpunkt D (Tag 75 ± 15) beobachtet werden. Dies könnte mit der Dosisreduktion von MMF als auch mit der Reduktion des Tacrolimus-Zielspiegels zum Zeitpunkt B erklärt werden (siehe 3.2). Nach Zeitpunkt C (Tag 28 ± 3) erfolgt zudem eine Dosisreduktion von Prednisolon, sowohl der Zielspiegel für Tacrolimus als auch die Dosis von MMF bleiben dabei nahezu unverändert. In den MLR mit unbestrahlten Spender-PBMC zeigt sich eine weitere Reduktion von Zeitpunkt B zu Zeitpunkt C, wobei dies im Gegensatz zu allen anderen IFN- γ -Elispot-Assays steht (siehe Abb. 3.7). Anzunehmen ist dabei, dass es durch die Interaktion zwischen noch sezernierenden Spender-PBMC und Empfänger-PBMC zu verfälschten Ergebnissen kommen könnte.

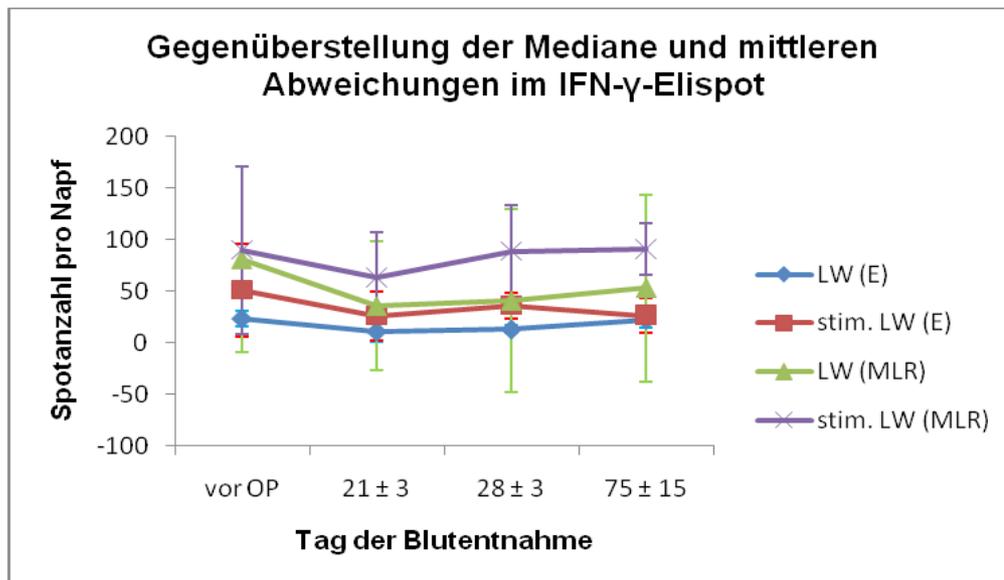


Abb. 4.1: Gegenüberstellung der Mediane und mittleren Abweichungen im IFN- γ -Elispot der Empfänger und der MLR mit bestrahlten Spender-PBMC; E = Empfänger, MLR = Lymphozytenmischreaktion

In einer Studie von Nickel und Mitarbeiter aus dem Jahre 2004 wurde ebenfalls ein Follow-up im IFN- γ -Elispot untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Abnahme der Spotanzahlen nach drei Monaten (entspricht Zeitpunkt D). Nach sechs Monaten war jedoch wieder ein Anstieg zu verzeichnen, wobei zu diesem Zeitpunkt von ursprünglich 52 nur noch acht Patienten an der Studie teilgenommen hatten (124).

Ein Anstieg der Spotanzahlen im Elispot-Assay scheint generell nach einer Nierentransplantation aufzutreten, wobei dies über einen längeren Zeitraum zu untersuchen wäre.

Bestard et al. konnten im IFN- γ -Elispot zeigen, dass Patienten, bei denen vor Transplantation weniger als 25 Spots pro Napf (3×10^5 PBMC/Napf) gemessen wurden, nach sechs Monaten weniger opportunistische Infektionen aufwiesen als Patienten mit mehr als 25 Spots pro Napf (137).

In einer Studie von van de Booghaardt und Mitarbeiter wurden steigende Spotanzahlen nach einer akuten renalen Abstoßungsreaktion (ARE) gemessen (23).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den Transplantatempfängern weder erhöhte Elispot-Anzahlen noch eine bioptisch gesicherte ARE nach Transplantation nachgewiesen werden. Aus diesem Grund

konnte eine Abhängigkeit zwischen präoperativ erhöhten Elislots und einer ARE nicht weiter nachgegangen werden. Dabei belegen zahlreiche Studien einen Zusammenhang dieser beiden Werte (37,129,138).

4.3.2.2 IL-17-Elispot-Assay

Interleukin 17A ist der am besten untersuchte Subtyp der IL-17-Familie. Er generiert ähnlich zu IFN- γ eine proinflammatorische Antwort, wirkt jedoch zu einem früheren Zeitpunkt (27). Seine Hauptaufgabe besteht in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. Inwieweit die beiden Zytokine IFN- γ und IL-17A interagieren, scheint noch nicht endgültig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass IFN- γ die Zytokinproduktion von IL-17A inhibiert (11). Auch scheint es Zelltypen zu geben, die sowohl IFN- γ als auch IL-17A produzieren können (5,10).

Vieles spricht dafür, dass IL-17 ein bedeutender Faktor für die Annahmewahrscheinlichkeit eines transplantierten Organs ist (139,140). Hsieh und Mitarbeiter fanden eine vermehrte Menge an IL-17-mRNA postoperativ bei Mäusen mit akuter Rejektionsepisoden (27).

In der vorliegenden Arbeit konnten ausschließlich die mit OKT3-stimulierten Nüpfle im Elispot-Assay ausgewertet werden (Abb. 4.2). Im Gegensatz zu den unstimulierten IFN- γ -Elisspots zeigten die Leerwerte im IL-17-Elispot keine ausreichende Zytokinausschüttung,

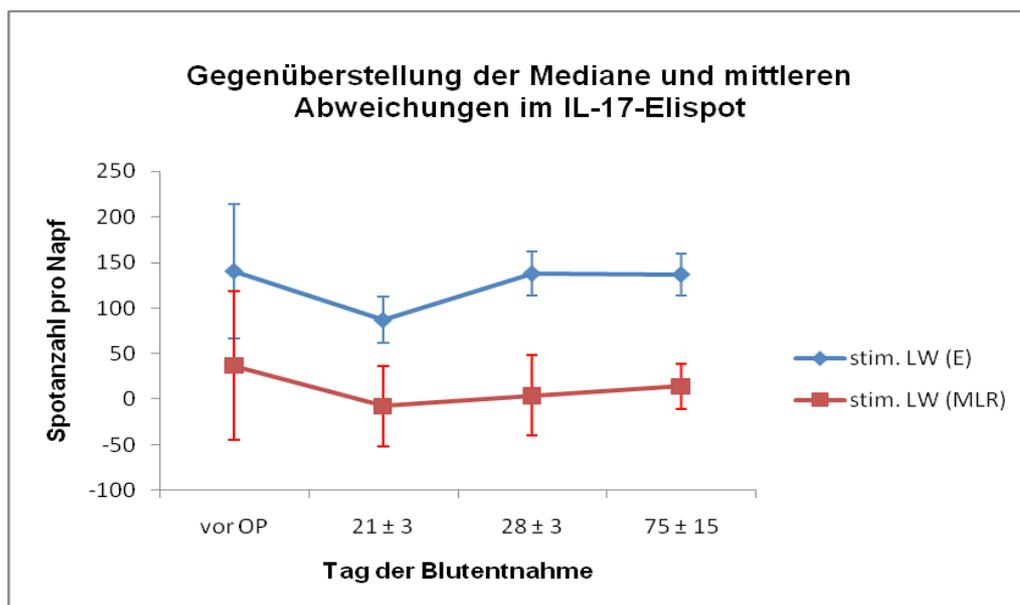


Abb. 4.2: Gegenüberstellung der Mediane und mittleren Abweichungen der Empfänger und MLR mit bestrahlten Spender-PBMC im IL-17-Elispot; E = Empfänger MLR = Lymphozytenmischreaktion

weder in den Elispot-Assays der Empfänger noch in den Lymphozytenmischkulturen.

Die IL-17-Elispot-Assays der Empfänger-PBMC und der MLR mit den bestrahlten Spender-PBMC wiesen ähnliche Verläufe auf. Sowohl bei stimulierten IL-17-Elispot-Assays der Empfänger-PBMC als auch bei der MLR mit den bestrahlten Spender-PBMC

zeigte sich die größte Spotanzahl zum Zeitpunkt A (vor Tx). Postoperativ dagegen konnte in beiden IL-17-Elispot-Assays ein Anstieg der Spotanzahlen von Zeitpunkt B (Tag 21 ± 3) bis Zeitpunkt D (Tag 75 ± 15) nachgewiesen werden. In den Elispot-Ergebnissen der Empfänger zeigte sich zum Zeitpunkt C (Tag 21 ± 3) eine nur leicht erhöhte Spotanzahl als zum Zeitpunkt D. Die MLR mit den unbestrahlten Spender-PBMC zeigte dagegen große Unterschiede zu den anderen beiden IL-17-Elispot-Assays (vgl. Abb. 3.12). Am ehesten ist dies auf die nicht eruierbare Interaktion zwischen noch sezernierenden Spender-PBMC und Empfänger-PBMC zurückzuführen. Daher sollten für valide Ergebnisse auch in Zukunft in Lymphozytenmischreaktionen die Spender-PBMC vorher bestrahlt werden.

Wie auch bei den Ergebnissen des IFN- γ -Elispots konnte auch bei den Ergebnissen des IL-17-Elispot der Zusammenhang mit möglichen oder stattgefundenen Abstoßungsreaktionen nicht untersucht werden (siehe 4.3.2.1).

Es bleibt unklar, inwieweit IL-17 als Marker für eine mögliche Abstoßungsreaktion bzw. für ein Immunmonitoring geeignet ist. Auch gibt es bisher keine vergleichbaren Studien, die ein Follow-up von IL-17 im Elispot-Assay untersucht haben. Jedoch legen die ähnlichen Verläufe von IFN- γ - und IL-17-Elispot-Assays nahe, dass IL-17 möglicherweise eine ähnliche Aussagekraft wie IFN- γ in Bezug auf die Abschätzung eines Transplantatüberlebens haben könnte.

4.3.2.3 IFN- γ -Elispot-Assay und IL-17-Elispot-Assay im Vergleich

Die Spotanzahlen vor Transplantation waren bei den IFN- γ - und IL-17-Elispot-Assays im Vergleich zu den postoperativen Werten erhöht. Bei beiden proinflammatorischen Zytokinen kann eine erhöhte Grundreaktivität der Patienten festgestellt werden. Die Abnahme der Spotanzahlen nach Transplantation war sowohl im IFN- γ -Elispot als auch im IL-17-Elispot deutlich, was zunächst mit der immunsuppressiven Therapie erklärt werden kann. Auch wenn es vereinzelt zu erneuter Spotabnahme von Zeitpunkt C auf D kam, bleibt festzuhalten, dass die Spotanzahlen nach Zeitpunkt B im Verlauf wieder auf ein relativ hohes Niveau ansteigen. Eine Untersuchung beider Zytokine über mindestens zwölf Monate wäre erstrebenswert, um signifikante Ergebnisse erzielen zu können.

Generell kann gesagt werden, dass die Verläufe von IFN- γ und IL-17 im Elispot-Assay in der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind. Demnach spricht vieles für ein ähnliches Verhalten der beiden Zytokine nach einer Nierentransplantation. Postoperativ wäre demnach ein Immunmonitoring von IFN- γ und IL-17 sinnvoll.

4.4 HLA-Merkmale und Serumkreatininmolarität

HLA-Merkmale galten bisher als Prädiktoren für die Annahmewahrscheinlichkeit eines transplantierten Organs, wobei es Anzeichen für keine größere Annahmewahrscheinlichkeiten bei genetisch verwandten Paaren gibt (38).

Da es bei keinem der untersuchten Paare zu Abstoßungsepisoden oder der Bildung von HLA-Antikörpern kam, konnte weder der Zusammenhang von genetischen Faktoren zu Abstoßungsreaktionen, noch der Zusammenhang von Elispot-Ereignissen zu HLA-Antikörpern untersucht werden. Dennoch bleibt festzuhalten, dass es trotz teilweise maximal schlechten Mismatchformeln (vgl. Tab. 3.1 b) zu keiner Bildung von Antikörpern gekommen ist.

Zahlreiche Studien belegen, dass die Anzahl der Elispot-Ereignisse nicht mit den unterschiedlichen HLA-Merkmalen korreliert (36,37,124). In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Paaren mit günstigerem und Paaren mit ungünstigerem HLA-Mismatch nachgewiesen werden. Zeigte sich in den IFN- γ -Elispots eine geringfügig höhere Spotanzahl bei den Paaren mit günstigerem HLA-Mismatch, so war dies bei dem stimulierten IL-17-Elispot genau umgekehrt. Dies ist am ehesten mit der geringen Patientenzahl zu begründen. Eine Einflussnahme unterschiedlicher HLA-Merkmale für die Untersuchungsergebnisse im Elispot-Assay ist weder in der vorliegenden Arbeit noch in der oben beschriebenen Literatur nachgewiesen. Die Serumkreatininmolaritäten zeigen deutliche Unterschiede. Vor Transplantation waren die Werte mit einem Median von 649,5 $\mu\text{mol/l}$ erwartungsgemäß stark erhöht, wobei die Mindestkonzentration bei 411 $\mu\text{mol/l}$ lag. Nach Transplantation zeigten sich zu allen drei Zeitpunkten ähnlich niedrige Konzentrationen (Mediane: B: 128 $\mu\text{mol/l}$ | C: 124 $\mu\text{mol/l}$ | D: 128 $\mu\text{mol/l}$). Dabei nahmen die Werte der höchsten Konzentrationen kontinuierlich ab, wie in Abb. 4.3 verdeutlicht (B: 590 $\mu\text{mol/l}$ | C: 312 $\mu\text{mol/l}$ | D: 170 $\mu\text{mol/l}$). Auch bei Nickel und Mitarbeitern konnte eine vergleichbar niedrige Serumkreatininmolarität nach sechs (158 $\mu\text{mol/l}$) bzw. zwölf Monaten (140 $\mu\text{mol/l}$) gemessen werden. Hricik und Mitarbeiter zeigten zudem, dass sich keine Korrelation zwischen den Elispot-Ereignissen vor Transplantation und der Serumkreatininmolarität nach sechs bzw. zwölf Monaten ergab (141). Dagegen spricht eine Studie von Begard et al., die bei Patienten mit mehr als 25 Spots pro Napf (siehe 4.3.2.1) schlechtere Nierenparameter (Serumkreatinin/GFR) nach sechs bzw. zwölf Monaten messen konnten, auch wenn das Outcome zu diesen Zeitpunkten gleich ausfiel (137).

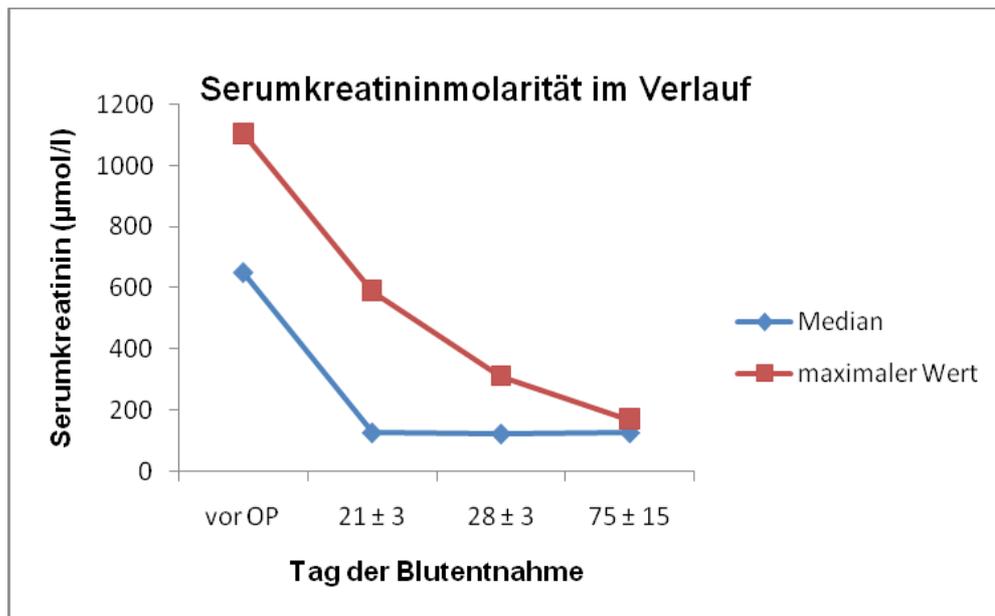


Abb. 4.3: Darstellung der Serumkreatininmolarität im Verlauf

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollte die Anwendung von Elispot-Untersuchungen zum Nachweis einer Toleranzentwicklung bei den Empfängern einer Nierentransplantation untersucht werden. Als Methode wurde der Elispot-Assay mit den proinflammatorischen Zytokinen IFN- γ und IL-17 verwendet. Versuche mit FKS-freiem Medium blieben erfolglos. Zunächst konnte ein geeignetes Testverfahren für die Zytokine IFN- γ und IL-17 erstellt werden. Bei der Untersuchung der zwölf Patientenpaare konnte jedoch keine Trendkurve hin zu einer verringerten proinflammatorischen Zytokinproduktion nach Transplantation beobachtet werden. Die deutlichsten Abnahmen waren kurz nach Transplantation messbar und sind eher auf die ausgeprägte medikamentöse immunsuppressive Therapie zurückzuführen.

Weiterhin konnten bei keinem der Patientenpaare eine Abstoßungsreaktion beobachtet werden, weshalb keine Zusammenhänge zwischen den Elispot-Ergebnissen und bioptisch gesicherten Abstoßungsreaktionen untersucht werden konnten.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass das Elispot-Verfahren durch seine Sensitivität weiterhin die Methode der Wahl darstellt, um mögliche Abstoßungsreaktionen festzustellen. IFN- γ scheint als Marker geeignet. Ob IL-17 in ein mögliches Immunmonitoring einbezogen werden sollte, muss noch gezeigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen keine eindeutige klinische Schlussfolgerung zu. Dies ist durch mehrere Faktoren bedingt: Zum einen sollte bei weiteren Untersuchungen ein Weg gefunden werden, größere Fallzahlen einzubeziehen. Zudem sollte der Untersuchungszeitraum auf mindestens sechs bis zwölf Monate ausgeweitet werden. Möglich wäre zudem eine retrospektive Metaanalyse, die Auffälligkeiten bestimmter Parameter (Serumkreatininmolarität, HLA-Antikörper) oder klinischer Verläufe (Abstoßungsreaktionen etc.) aufzeigt und untersucht. Als Studienansatz könnte die Reduktion von Immunsuppressiva nach drei oder sechs Monaten untersucht und deren Einfluss auf die Spotanzahlen im IFN- γ - und IL-17-Elispot-Assay gemessen werden. Wichtig dabei wäre eine engmaschige Kontrolle der Patienten, um mögliche Komplikationen zu vermeiden.

Neben der Elispot-Methode als Immunmonitoring sollten jedoch noch weitere Ansätze einbezogen werden, um eine Abstoßungsreaktion entweder nachzuweisen oder abzuschätzen.

Lie und Mitarbeiter konnte einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Menge an Granzym B und Perforin mRNA im Urin und einer stattgefundenen Abstoßungsreaktion nachweisen (142).

Sowohl Poggio et al. als auch Najafian et al. untersuchten als weiterer möglicher Marker Spender-spezifische HLA-DR Peptide zusammen mit Empfänger-PBMC im IFN- γ -Elispot-Assay. Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Ausschüttung von IFN- γ und Rejektionsepisoden bzw. einer chronischer Transplantatnephropathie (143,144).

Choi und Mitarbeiter untersuchten zudem die unterschiedlichen Familienkonstellationen bei Empfängern und Spendern auf Unterschiede bei der Annahmewahrscheinlichkeit nach Nierentransplantationen. Dabei wurde die höchste Annahmewahrscheinlichkeit bei Kind (S) zu Vater (E) generiert, wobei die Nierenspende von Mutter (S) auf Kind (E) die geringste Annahmewahrscheinlichkeit bot (Abb. 4.4). Dies wird mit der Präsensibilisierung der Mutter durch das fötale Blut erklärt (145). Bereits seit den 1990er Jahren wird versucht, durch Knochenmarktransplantation eine höhere Annahmewahrscheinlichkeit des gespendeten Organs zu erzielen (146). Auch gibt es neuere Studien, die eine erhöhte Annahmewahrscheinlichkeit bei zeitlich begrenzter Immunsuppression aufzeigen (147,148). Dennoch sind die Fallzahlen bisher noch zu gering, um die Ergebnisse der Studien als Standardverfahren verwenden zu können.

Überlebensrate in Abhängigkeit zur Familienkonstellation

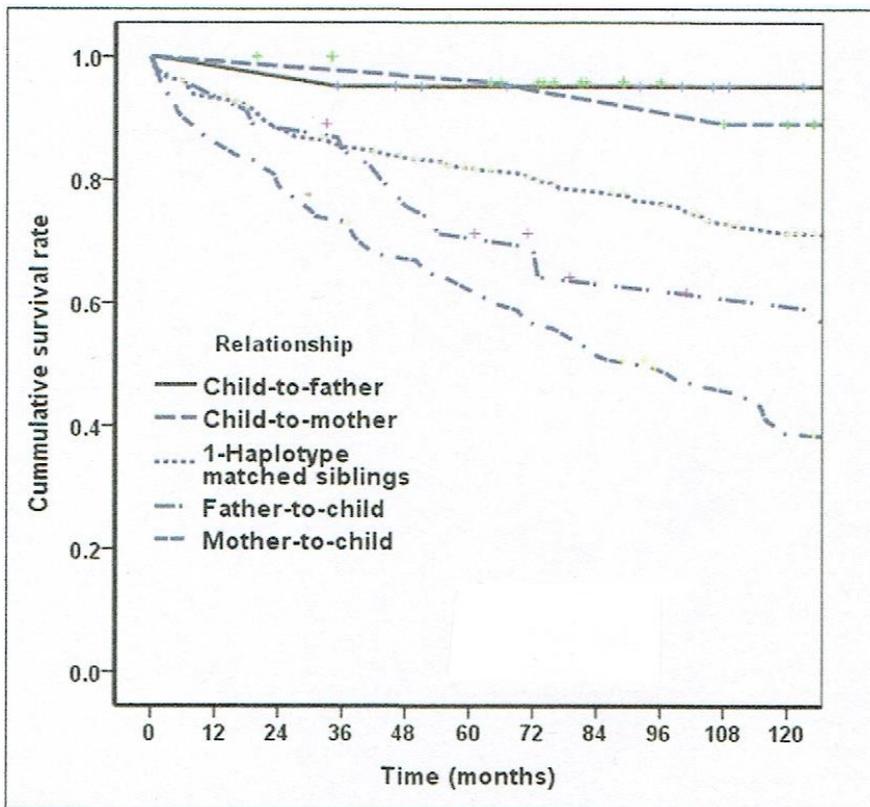


Abb. 4.4: Überlebensrate bei Lebendnierenempfänger in Abhängigkeit zur Familienkonstellation; aus (145)

Das Elispot-Verfahren scheint derzeit die beste Methode eines validen Immunmonitorings zu bieten. Dabei bedarf es lediglich einer Blutentnahme, um eine mögliche Abstoßungsreaktion abschätzen oder feststellen zu können. Das Verfahren ist relativ einfach und sicher durchzuführen und könnte standardisiert angewendet werden. Nachteile für die Empfänger einer Transplantation ergeben sich dadurch nicht. Zusammen mit anderen Verlaufsparemtern (Serumkreatininmolarität, glomerulären Filtrationsrate) könnte festgestellt werden, ob eine Abstoßungsreaktion zu erwarten ist, oder ob die medikamentöse, immunsuppressive Therapie verringert oder gar abgesetzt werden könnte.

5 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Verlauf der zellulären Immunantwort bei Lebendnierenempfängern -

Messung von IFN- γ und IL-17 im Elispot-Assay

eingereicht von Conrad Grehn

angefertigt am Institut für Klinische Immunologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

betreut von Prof. Dr. Ulrich Sack

Februar 2015

Die Nierentransplantation ermöglicht Patienten die Wiederherstellung der Nierenfunktion. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an Organen nimmt dabei die Zahl der Transplantationen von einem lebenden Spender stetig zu. Zudem ermöglichen die präzisen und genauen Vorbereitungen und Abläufe bei Lebendnierenspenden eine bessere 5-Jahres-Überlebensrate als bei Kadaverspenden.

Die genetische Verschiedenheit zwischen Spender und Empfänger bedingt jedoch eine lebenslange immunsuppressive Therapie, um Abstoßungsreaktionen und damit das Scheitern einer Organtransplantation zu verhindern. An den Universitätskliniken Leipzig und Halle/Saale besteht diese Therapie aus einer Dreifachkombination von Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil und Prednisolon, wobei mögliche Nebenwirkungen wie opportunistische Infektionen, kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen sowie Tumore in Kauf genommen werden. Zudem besteht für den immunsupprimierten Organismus die ständige Gefahr einer Abstoßungsreaktion. Diese Aspekte führen bei den Empfängern zu einer massiven Einschränkung der Gesundheit und Lebensqualität. Inwieweit die ausgeprägte Immunsuppression notwendig ist, bleibt unklar und muss individuell festgelegt werden. Bisher existiert kein geeignetes Verfahren für ein

Immunmonitoring, weshalb in vielen Fällen eine umfangreiche und überdosierte Immunsuppression in Kauf genommen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein geeignetes Testverfahren, der Elispot-Assay, für die Expression der beiden proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-17 erstellt. Dafür wurden die PBMC der Spender und Empfänger aus Vollblut separiert, um sie anschließend sowohl separat als auch in einer Lymphozytenmischreaktion zu untersuchen. Die Darstellung von IL-17 konnte nur aufgrund einer zusätzlichen Stimulation mit OKT3 gelingen, während der IFN- γ -Elispot sowohl im Leerwert als auch unter Stimulation mit IL-2 zu ausreichenden Spotanzahlen führte. Die Spotanzahlen der Spender-PBMC wurden mit Hilfe von γ -Strahlung signifikant reduziert (IFN- γ : $p=0,047$ | IFN- γ + IL-2: $p=0,007$ | IL-17: $p = 0,001$), um in den Lymphozytenmischreaktionen die alleinige Zytokinausschüttung der Empfänger-PBMC messen zu können. Die Spender-PBMC fungierten dabei nur als Antigene.

Insgesamt konnten zwischen 2009 und 2012 zwölf von siebzehn Patientenpaaren in die Studie eingeschlossen werden. Die Spotanzahlen der Paare wurden dabei sowohl im IFN- γ - als auch im IL-17-Elispot-Assay zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen (vor Transplantation | 21 ± 3 d postoperativ | 28 ± 3 d postoperativ | 75 ± 15 d postoperativ). In den meisten Fällen zeigte sich vor Transplantation eine erhöhte Spotanzahl im Vergleich zu den drei postoperativen Werten. Zudem stiegen die Spotanzahlen sowohl für IFN- γ als auch für IL-17 nach niedrigen Messergebnissen kurz nach der Transplantation im postoperativen Verlauf wieder an und erreichten in einigen Fällen die Spotanzahl der präoperativen Ausgangswerte. Ein signifikanter Unterschied konnte aufgrund der geringen Fallzahl nicht erreicht werden. Die kurzfristige Reduktion der Spotanzahlen postoperativ ist dabei aller Wahrscheinlichkeit nach auf die hohen Dosen an immunsuppressiven Medikamenten zurückzuführen. Insgesamt zeigten die Verläufe der IFN- γ - und der IL-17-Elispot-Assays ähnliche Verläufe. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der IL-17-Elispot-Assay in Bezug auf mögliche Abstoßungsreaktionen eine ähnliche Aussagekraft besitzen könnte wie der bereits vielfach untersuchte IFN- γ -Elispot-Assay.

Weiterhin wurden die Messergebnisse mit der Serumkreatininmolarität verglichen. Diese zeigte präoperativ höhere Molaritäten als postoperativ, wobei die postoperativen Molaritäten im Verlauf, im Gegensatz zu den Elispot-Messungen, abnahmen, was das Einsetzen der Nierenfunktion widerspiegelt.

Unter den zwölf Patientenpaaren gab es keine einzige nachgewiesene akute Abstoßungsreaktion, der Verlauf der Serumkreatininmolaritäten war bei allen zwölf

Empfängern vergleichbar. Demzufolge konnten die Werte der Elispot-Assays nicht herangezogen werden, um an ihnen eine Abstoßungsreaktion der transplantierten Nieren erkennen zu können. Das präoperative Abschätzen einer möglichen Abstoßungsreaktion anhand der Elispot-Assays konnte aufgrund fehlender Abstoßungsreaktionen ebenfalls nicht untersucht werden.

Zusätzlich wurde bei den Patienten eine HLA-Typisierung vorgenommen, wobei der Bereich von optimalen bis maximal ungünstigen Konstellationen reichten (HLA-Mismatch: 0-0-0 bis 2-2-2). Auch hier konnten die Ergebnisse nicht mit möglichen Abstoßungsreaktionen verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Varianten untersucht, die das Abschätzen einer Immunreaktion nach Nierentransplantation (Immunmonitoring) ermöglichen könnten. Aufgrund fehlender Abstoßungsreaktionen bei den Empfängern konnte das Testverfahren nicht an den klinischen Verläufen validiert werden. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Messverfahren kann jedoch eine neue und größer angelegte Studie erfolgen, die in Zukunft ein Immunmonitoring bei Patienten nach Nierentransplantation ermöglicht.

6 Abstract

Introduction

Since the first kidney transplantation in the 1950ies, kidney transplantation is still being challenged by graft dysfunction and complete graft failure. Permanent immunosuppressive treatment is mandatory to avoid an unfavourable outcome. The treatment with Prednisolone, Tacrolimus and Mycophenolat-Mofetil may cause toxic side effects resulting in Diabetes mellitus, hypertension, infections and cancer.

In the present study we tried to demonstrate that the amount of spots in the Enzyme linked immunospot assay (Elispot-Assay) of IFN- γ and IL-17 correlates with the probability of graft dysfunction and complete graft failure. We also compared the results to clinical parameters.

Methods

Between the years 2009 and 2012, twelve pairs of related living kidney transplantations were included in this study. From each pair blood samples were taken at four time points (before transplantation, and at 21 ± 3 , 28 ± 3 and 75 ± 15 days after kidney transplantation, respectively). After establishing the technique of IFN- γ - and IL-17-Elispot-Assays, we separated the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and performed follow up examinations at the four time points mentioned above. The PBMC of each donor and each recipient were examined separately, and in addition together in a lymphocyte mixed reaction. We stimulated the PBMC of the IFN- γ -Elispot with Interleukin-2 (IL-2) and the PBMC of the IL-17-Elispot with OKT3 to get significant characteristics. PBMC of the donors were irradiated with 30 Gy before mixing them with the PBMC of the recipients. We also took the HLA-matches and serum creatinine molarity to compare important clinical parameters with the results of the Elispot-Assays.

Results

Sufficient spots were measured using the unstimulated and stimulated IFN- γ -Elispot and the stimulated IL-17-Elispot. Radiation was significant at all three tests (IFN- γ : $p=0,047$ | IFN- γ + IL-2: $p=0,007$ | IL-17: $p = 0,001$). All twelve recipients showed a high number of spots before transplantation in both types of Elispot-Assays and most of them an increasing number of spots after a minimal turning point three weeks after transplantation.

Due to the small number of cases, no significant results could be obtained at follow up. Non recipient developed a graft rejection as proven by biopsy or graft failure. The molarity of serum creatinine was permanently reduced whereas it was high before transplantation. Because of the absence of any rejection episodes, HLA matches could not be compared.

Discussion

Due to the absence of rejection episodes or graft failure, no prediction for rejection by the IFN- γ - and IL-17-Elispot was possible. The low number of cases of living related kidney transplantation demonstrated the challenge of the investigation of living related kidney transplantation. Although we could prove a significant effect of the irradiation of PBMC, there was no significant result in the follow up investigations. A higher number of cases are needed in future investigations. The established method of the IFN- γ - and IL-17-Elispot can be used in a future study with an extended number of cases and a longer follow up of time.

7 Literaturverzeichnis

1. Kindt, T. J., B. A. Osborne, and R. A. Goldsby. 2007. IMMUNOLOGY, 6th ed. W. H. Freeman, New York.
2. Janeway, C., and K. P. Murphy, editors. 2009. JANEWAY IMMUNOLOGIE, 7th ed. Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg.
3. Mosmann, C. 1987. TWO TYPES OF MOUSE HELPER T-CELL CLONE: IMPLICATIONS FOR IMMUNE REGULATION. *Immunol. Today*, 8:223–227.
4. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 AND TH2 CELLS: DIFFERENT PATTERNS OF LYMPHOKINE SECRETION LEAD TO DIFFERENT FUNCTIONAL PROPERTIES. *Annu. Rev. Immunol*, 7:145–173.
5. Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno et al. 2007. SURFACE PHENOTYPE AND ANTIGENIC SPECIFICITY OF HUMAN INTERLEUKIN 17–PRODUCING T HELPER MEMORY CELLS. *Nat Immunol*, 8:639–646.
6. Schlegel, P. M. IDENTIFIZIERUNG INTERLEUKIN-17 POSITIVER ZELLPOPULATIONEN BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
7. Littman, D. R., and A. Y. Rudensky. 2010. TH17 AND REGULATORY T CELLS IN MEDIATING AND RESTRAINING INFLAMMATION. *Cell*, 140:845–858.
8. Rouvier, E., M. F. Luciani, M. G. Mattéi, F. Denizot, and P. Golstein. 1993. CTLA-8, CLONED FROM AN ACTIVATED T CELL, BEARING AU-RICH MESSENGER RNA INSTABILITY SEQUENCES, AND HOMOLOGOUS TO A HERPESVIRUS SAIMIRI GENE. *J. Immunol*, 150:5445–5456.
9. Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard et al. 2006. TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA INDUCES DEVELOPMENT OF THE T(H)17 LINEAGE. *Nature*, 441:231–234.
10. Ye, J., X. Su, E. C. Hsueh, Y. Zhang, J. M. Koenig et al. 2011. HUMAN TUMOR-INFILTRATING TH17 CELLS HAVE THE CAPACITY TO DIFFERENTIATE INTO IFN-GAMMA+ AND FOXP3+ T CELLS WITH POTENT SUPPRESSIVE

FUNCTION. *Eur. J. Immunol*, 41:936–951.

11. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy et al. 2005. INTERLEUKIN 17-PRODUCING CD4+ EFFECTOR T CELLS DEVELOP VIA A LINEAGE DISTINCT FROM THE T HELPER TYPE 1 AND 2 LINEAGES. *Nat. Immunol*, 6:1123–1132.
12. Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata et al. 2003. INCREASED EXPRESSION OF INTERLEUKIN 17 IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. *Gut*, 52:65–70.
13. Hizawa, N., M. Kawaguchi, S.-K. Huang, and M. Nishimura. 2006. ROLE OF INTERLEUKIN-17F IN CHRONIC INFLAMMATORY AND ALLERGIC LUNG DISEASE. *Clin. Exp. Allergy*, 36:1109–1114.
14. Laan, M., and Lindén. 2002. IL-17 AS A POTENTIAL TARGET FOR MODULATING AIRWAY NEUTROPHILIA. *Curr. Pharm. Des*, 8:1855–1861.
15. Taylor, P. C., A. M. Peters, E. Paleolog, P. T. Chapman, M. J. Elliott et al. 2000. REDUCTION OF CHEMOKINE LEVELS AND LEUKOCYTE TRAFFIC TO JOINTS BY TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA BLOCKADE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS. *Arthritis Rheum*, 43:38–47.
16. Kotake, S., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Matsuzaki, K. Itoh et al. 1999. IL-17 IN SYNOVIAL FLUIDS FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS IS A POTENT STIMULATOR OF OSTEOCLASTOGENESIS. *J. Clin. Invest*, 103:1345–1352.
17. Matusevicius, D., P. Kivisäkk, B. He, N. Kostulas, V. Ozenci et al. 1999. INTERLEUKIN-17 MRNA EXPRESSION IN BLOOD AND CSF MONONUCLEAR CELLS IS AUGMENTED IN MULTIPLE SCLEROSIS. *Mult. Scler*, 5:101–104.
18. Brandt, C. UNTERSUCHUNG DER MOLEKULAREN MECHANISMEN DER T-ZELL MODULATION BEI DER THERAPIE MIT GERING DOSIERTEM CYCLOSPORIN A IN PATIENTEN MIT ATOPISCHER DERMATITIS. Dissertation 2011, Berlin.
19. Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori et al. 2006. FOXP3+ CD25+ CD4+ NATURAL REGULATORY T CELLS IN DOMINANT SELF-TOLERANCE AND AUTOIMMUNE DISEASE. *Immunol. Rev*, 212:8–27.

20. Bestard, O., J. M. Cruzado, M. Mestre, A. Caldés, J. Bas et al. 2007. ACHIEVING DONOR-SPECIFIC HYPORESPONSIVENESS IS ASSOCIATED WITH FOXP3+ REGULATORY T CELL RECRUITMENT IN HUMAN RENAL ALLOGRAFT INFILTRATES. *J. Immunol*, 179:4901–4909.
21. Sawitzki, B., S. Schlickeiser, P. Reinke, and H.-D. Volk. 2011. MONITORING TOLERANCE AND REJECTION IN ORGAN TRANSPLANT RECIPIENTS. *Biomarkers*, 16:42–50.
22. Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume. 2004. INTERFERON-GAMMA: AN OVERVIEW OF SIGNALS, MECHANISMS AND FUNCTIONS. *J. Leukoc. Biol*, 75:163–189.
23. van den Boogaardt, D. E. M., P. P. M. C. van Miert, Y. J. H. de Vaal, J. W. de Fijter, F. H. J. Claas et al. 2006. THE RATIO OF INTERFERON-GAMMA AND INTERLEUKIN-10 PRODUCING DONOR-SPECIFIC CELLS AS AN IN VITRO MONITORING TOOL FOR RENAL TRANSPLANT PATIENTS. *Transplantation*, 82:844–848.
24. Gerrits, J. H., J. van de Wetering, J. J. M. Drabbels, F. H. J. Claas, W. Weimar et al. 2008. DONOR-REACTIVE CYTOKINE PROFILES AFTER HLA-IDENTICAL LIVING-RELATED KIDNEY TRANSPLANTATION. *Nephrol. Dial. Transplant*, 23:2016–2023.
25. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 AND TH17 CELLS. *Annu. Rev. Immunol*, 27:485–517.
26. Shibata, K., H. Yamada, H. Hara, K. Kishihara, and Y. Yoshikai. 2007. RESIDENT VDELTA1+ GAMMADELTA T CELLS CONTROL EARLY INFILTRATION OF NEUTROPHILS AFTER ESCHERICHIA COLI INFECTION VIA IL-17 PRODUCTION. *J. Immunol*, 178:4466–4472.
27. Hsieh, H. G., C. C. Loong, W. Y. Lui, A. Chen, and C. Y. Lin. 2001. IL-17 EXPRESSION AS A POSSIBLE PREDICTIVE PARAMETER FOR SUBCLINICAL RENAL ALLOGRAFT REJECTION. *Transpl. Int*, 14:287–298.
28. Petechuk, D. 2006. ORGAN TRANSPLANTATION, 1st ed. Greenwood Press, Westport, Conn.
29. Harrison, J.H., J.P. Marrill, and J.E. Murray. 1956. RENAL

- HOMOTRANSPLANTATION IN IDENTICAL TWINS. *Surgical Forum*, 6:432-6.
30. Murray, J., J. P. MERRILL, J. H. HARRISON, R. E. WILSON, and G. J. DAMMIN. 1963. PROLONGED SURVIVAL OF HUMAN-KIDNEY HOMOGRAFTS BY IMMUNOSUPPRESSIVE DRUG THERAPY. *N. Engl. J. Med*, 268:1315–1323.
 31. Schwartz, R., J. Stack, and W. Dameshek. 1958. EFFECT OF 6-MERCAPTOPYRIMIDINE ON ANTIBODY PRODUCTION. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 99:164–167.
 32. National Institut of Health. 2012 ATLAS OF CKD & ESRD. <http://www.usrds.org/atlas.aspx>. Accessed April 12, 2013.
 33. Deutsche Stiftung Organtransplantation. JAHRESBERICHT 2011. http://www.dso.de/uploads/tx_dsod/DSO_JB_d_2011.pdf. Accessed June 05, 2012.
 34. Bundesministerium für Gesundheit. ENTSCHEIDUNGSLÖSUNG BEI DER ORGANSPENDE TRITT IN KRAFT. http://www.bmg.bund.de/fileadmin/dateien/Pressemitteilungen/2012/2012_04/121030_PM_74_Entscheidungsloesung.pdf. Accessed April 12, 2013.
 35. Tong, A., J. R. Chapman, G. Wong, J. de Bruijn, and J. C. Craig. 2011. SCREENING AND FOLLOW-UP OF LIVING KIDNEY DONORS: A SYSTEMATIC REVIEW OF CLINICAL PRACTICE GUIDELINES. *Transplantation*, 92:962–972.
 36. Kim, S. H., E. J. Oh, M. J. Kim, Y. J. Park, K. Han et al. 2007. PRETRANSPLANT DONOR-SPECIFIC INTERFERON-GAMMA ELISPOT ASSAY PREDICTS ACUTE REJECTION EPISODES IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS. *Transplant. Proc*, 39:3057–3060.
 37. Augustine, J. J., D. S. Siu, M. J. Clemente, J. A. Schulak, P. S. Heeger et al. 2005. PRE-TRANSPLANT IFN-GAMMA ELISPOTS ARE ASSOCIATED WITH POST-TRANSPLANT RENAL FUNCTION IN AFRICAN AMERICAN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS. *Am J Transplant*, 5:1971–1975.
 38. Ishikawa, N., T. Yagisawa, Y. Sakuma, T. Fujiwara, T. Kimura et al. 2012. KIDNEY TRANSPLANTATION OF LIVING UNRELATED DONOR-RECIPIENT COMBINATIONS. *Transplant. Proc*, 44:254–256.

39. Aubert, V., J.-P. Venetz, G. Pantaleo, and M. Pascual. 2009. LOW LEVELS OF HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN DONOR-SPECIFIC ANTIBODIES DETECTED BY SOLID PHASE ASSAY BEFORE TRANSPLANTATION ARE FREQUENTLY CLINICALLY IRRELEVANT. *Hum. Immunol.*, 70:580–583.
40. Vasilescu, E. R., E. K. Ho, A. I. Colovai, G. Vlad, A. Foca-Rodi et al. 2006. ALLOANTIBODIES AND THE OUTCOME OF CADAVER KIDNEY ALLOGRAFTS. *Hum. Immunol.*, 67:597–604.
41. Dierselhius, M. P., E. Spierings, J. Drabbels, M. Hendriks, C. Alaez et al. 2013. MINOR H ANTIGEN MATCHES AND MISMATCHES ARE EQUALLY DISTRIBUTED AMONG RECIPIENTS WITH OR WITHOUT COMPLICATIONS AFTER HLA IDENTICAL SIBLING RENAL TRANSPLANTATION. *Tissue Antigen*, 82:312–316.
42. Heinold, A., G. Opelz, S. Scherer, A. Ruhstroth, G. Laux et al. 2008. ROLE OF MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS IN RENAL TRANSPLANTATION. *Am. J. Transplant*, 8:95–102.
43. Stephen I. Alexander, N. Smith, N. Hu, D. Verran, A. Shun et al. 2008. CHIMERISM AND TOLERANCE IN A RECIPIENT OF A DECEASED-DONOR LIVER TRANSPLANT. *N. Engl. J. Med*, 358:369–374.
44. Subramanian, V., S. Ramachandran, C. Klein, J. R. Wellen, S. Shenoy et al. 2012. ABO-INCOMPATIBLE ORGAN TRANSPLANTATION. *International journal of immunogenetics*, 39:282–290.
45. Fournier, C., N. Pallet, Z. Cherqaoui, S. Pucheu, H. Kreis et al. 2012. VERY LONG-TERM FOLLOW-UP OF LIVING KIDNEY DONORS. *Transplant International*, 25:385–390.
46. Glotzer, O. S., T. P. Singh, M. H. Gallichio, D. J. Conti, and N. F. Siparsky. 2013. LONG-TERM QUALITY OF LIFE AFTER LIVING KIDNEY DONATION. *Transplant. Proc*, 45:3225–3228.
47. Weiss, J. AUSWIRKUNGEN EINER LEBENDNIERENSPENDE IM PRÄ-POST-VERGLEICH AUF DAS SOMATISCHE; PSYCHOSOZIALE UND PHYSISCHE BELASTUNGSERLEBEN UND DIE BEZIEHUNGSQUALITÄT VON SPENDERN UND EMPFÄNGERN: Dissertation 2012, Halle/Saale.
48. Webster, A. C., R. R. S. Taylor, J. R. Chapman, J. C. Craig, A. Webster et al.

2005. TACROLIMUS VERSUS CYCLOSPORIN AS PRIMARY IMMUNOSUPPRESSION FOR KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS. *Cochrane Database Syst Rev*, 19:CD003961.
49. Dalal, P., G. Shah, D. Chhabra, and L. Gallon. 2010. ROLE OF TACROLIMUS COMBINATION THERAPY WITH MYCOPHENOLATE MOFETIL IN THE PREVENTION OF ORGAN REJECTION IN KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 3:107–115.
50. Krejci, K., T. Tichy, P. Bachleda, and J. Zadrazil. 2010. CALCINEURIN INHIBITOR-INDUCED RENAL ALLOGRAFT NEPHROTOXICITY. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 154:297–306.
51. Pascual, J., J. Zamora, C. Galeano, A. Royuela, and C. Quereda. 2011. STEROID AVOIDANCE OR WITHDRAWAL IN KIDNEY TRANSPLANTATION. *Curr Opin Organ Transplant*, 16:600–605.
52. Cato, A. C. B., A. Nestl, and S. Mink. 2002. RAPID ACTIONS OF STEROID RECEPTORS IN CELLULAR SIGNALING PATHWAYS. *Sci. STKE*, 138:re9.
53. Stahn, C., and F. Buttgereit. 2008. GENOMIC AND NONGENOMIC EFFECTS OF GLUCOCORTICOIDS. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 4:525–533.
54. van Staa, T. P., H. G. Leufkens, L. Abenhaim, B. Zhang, and C. Cooper. 2000. ORAL CORTICOSTEROIDS AND FRACTURE RISK: RELATIONSHIP TO DAILY AND CUMULATIVE DOSES. *Rheumatology (Oxford)*, 39:1383–1389.
55. Vanrenterghem, Y. F. C., K. Claes, G. Montagnino, S. Fieuz, B. Maes et al. 2008. RISK FACTORS FOR CARDIOVASCULAR EVENTS AFTER SUCCESSFUL RENAL TRANSPLANTATION. *Transplantation*, 85:209–216.
56. Allison, A. C. 2005. MECHANISMS OF ACTION OF MYCOPHENOLATE MOFETIL. *Lupus*, 14:2–8.
57. Shapiro, R., M. L. Jordan, V. P. Scantlebury, C. Vivas, J. W. Marsh et al. 1999. A PROSPECTIVE, RANDOMIZED TRIAL OF TACROLIMUS / PREDNISONE VERSUS TACROLIMUS / PREDNISONE / MYCOPHENOLATE MOFETIL IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS. *Transplantation*, 67:411–415.
58. Ojo, A. O., H. U. Meier-Kriesche, J. A. Hanson, A. B. Leichtman, D. Cibrik et al. 2000. MYCOPHENOLATE MOFETIL REDUCES LATE RENAL ALLOGRAFT

- LOSS INDEPENDENT OF ACUTE REJECTION. *Transplantation*, 69:2405–2409.
59. Fourtounas, C., P. Dousdampanis, P. Sakellaraki, M. Rodi, T. Georgakopoulos et al. 2010. DIFFERENT IMMUNOSUPPRESSIVE COMBINATIONS ON T-CELL REGULATION IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS. *Am. J. Nephrol*, 32:1–9.
 60. Kern, W. V., D. Wagner, and H. H. Hirsch. 2005. INFEKTIONEN NACH ORGANTRANSPLANTATION. *Internist (Berl)*, 46:630–642.
 61. Simon, D. M., and S. Levin. 2001. INFECTIOUS COMPLICATIONS OF SOLID ORGAN TRANSPLANTATIONS. *Infect. Dis. Clin. North Am*, 15:521–549.
 62. Grim, S. A., and N. M. Clark. 2011. MANAGEMENT OF INFECTIOUS COMPLICATIONS IN SOLID-ORGAN TRANSPLANT RECIPIENTS. *Clin. Pharmacol. Ther*, 90:333–342.
 63. Alangaden, G. J., R. Thyagarajan, S. A. Gruber, K. Morawski, J. Garnick et al. 2006. INFECTIOUS COMPLICATIONS AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION: CURRENT EPIDEMIOLOGY AND ASSOCIATED RISK FACTORS. *Clin Transplant*, 20:401–409.
 64. Jeong, J. C., H. Ro, Y.-H. Hwang, H. K. Lee, J. Ha et al. 2010. CARDIOVASCULAR DISEASES AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION IN KOREA. *J. Korean Med. Sci*, 25:1589–1594.
 65. Lentine, K. L., D. C. Brennan, and M. A. Schnitzler. 2005. INCIDENCE AND PREDICTORS OF MYOCARDIAL INFARCTION AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION. *J. Am. Soc. Nephrol*, 16:496–506.
 66. Cosio, F. G., Y. Kudva, M. van der Velde, T. S. Larson, S. C. Textor et al. 2005. NEW ONSET HYPERGLYCEMIA AND DIABETES ARE ASSOCIATED WITH INCREASED CARDIOVASCULAR RISK AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION. *Kidney Int*, 67:2415–2421.
 67. Pérez-Flores, I., A. Sánchez-Fructuoso, N. Calvo, E. F. Valga, and A. Barrientos. 2010. INCIDENCE AND RISK FACTORS FOR THE METABOLIC SYNDROME AND POSTTRANSPLANT DIABETES IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS TAKING TACROLIMUS. *Transplant. Proc*, 42:2902–2904.
 68. Marcén, R., C. Galeano, A. Fernández-Rodríguez, S. Jiménez-Alvaro, J. L. Teruel et al. 2010. EFFECTS OF THE NEW IMMUNOSUPPRESSIVE AGENTS ON

THE OCCURRENCE OF MALIGNANCIES AFTER RENAL TRANSPLANTATION.
Transplant. Proc, 42:3055–3057.

69. Sodemann, U., C. Bistrup, and P. Marckmann. 2011. CANCER RATES AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION. *Dan Med Bull*, 58:A4342.
70. Vajdic, C. M., S. P. McDonald, M. R. E. McCredie, M. T. van Leeuwen, J. H. Stewart et al. 2006. CANCER INCIDENCE BEFORE AND AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION. *JAMA*, 296:2823–2831.
71. Kiberd, B. A., C. Rose, and J. S. Gill. 2009. CANCER MORTALITY IN KIDNEY TRANSPLANTATION. *Am. J. Transplant*, 9:1868–1875.
72. Bellisola, G., G. Tridente, F. Nacchia, F. Fior, and L. Boschiero. 2006. MONITORING OF CELLULAR IMMUNITY BY INTERFERON-GAMMA ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT SPOT ASSAY IN KIDNEY ALLOGRAFT RECIPIENTS: PRELIMINARY RESULTS OF A LONGITUDINAL STUDY. *Transplant. Proc*, 38:1014–1017.
73. Correa, R. R. M., J. R. Machado, M. V. da Silva, F. R. Helmo, C. S. O. Guimaraes et al. 2013. THE IMPORTANCE OF C4D IN BIOPSIES OF KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS. *Clinical and developmental Immunology*. 2013: 678180.
74. Puttarajappa, C., R. Ahspiro, and H. P. Tan. 2012. ANTIBODY-MEDIATED REJECTION IN KIDNEY TRANSPLANTATION: A REVIEW. *Journal of Transplantation*. 2012:193724.
75. Kreisel, D., A. S. Krupnick, A. E. Gelman, F. H. Engels, S. H. Popma et al. 2002. NON-HEMATOPOIETIC ALLOGRAFT CELLS DIRECTLY ACTIVATE CD8+ T CELLS AND TRIGGER ACUTE REJECTION: AN ALTERNATIVE MECHANISM OF ALLORECOGNITION. *Nat. Med*, 8:233–239.
76. Rogers, N. J., and R. I. Lechler. 2001. ALLORECOGNITION. *Am. J. Transplant*, 1:97–102.
77. Wood, K. J., and R. Goto. 2012. MECHANISMS OF REJECTION: CURRENT PERSPECTIVES. *Transplantation*, 93:1–10.
78. Wu, O., A. R. Levy, A. Briggs, G. Lewis, and A. Jardine. 2009. ACUTE REJECTION AND CHRONIC NEPHROPATHY: A SYSTEMATIC REVIEW OF

THE LITERATURE. *Transplantation*, 87:1330–1339.

79. Jardine, A. G., R. S. Gaston, B. C. Fellstrom, and H. Holdaas. 2011. PREVENTION OF CARDIOVASCULAR DISEASE IN ADULT RECIPIENTS OF KIDNEY TRANSPLANTS. *Lancet*, 378:1419–1427.
80. Meier-Kriesche, H.-U., J. D. Schold, T. R. Srinivas, and B. Kaplan. 2004. LACK OF IMPROVEMENT IN RENAL ALLOGRAFT SURVIVAL DESPITE A MARKED DECREASE IN ACUTE REJECTION RATES OVER THE MOST RECENT ERA. *Am. J. Transplant*, 4:378–383.
81. Mengel, M. 2010. UPDATE DER BANFF-KLASSIFIKATION. *Nephrologe*, 5:494–500.
82. Lachmann, N., P. I. Terasaki, K. Budde, L. Liefeldt, A. Kahl et al. 2009. ANTI-HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN AND DONOR-SPECIFIC ANTIBODIES DETECTED BY LUMINEX POSTTRANSPLANT SERVE AS BIOMARKERS FOR CHRONIC REJECTION OF RENAL ALLOGRAFTS. *Transplantation*, 87:1505–1513.
83. Joseph, J. T., D. B. Kingsmore, B. J. Junor, J. D. Briggs, Y. Mun Woo et al. 2001. THE IMPACT OF LATE ACUTE REJECTION AFTER CADAVERIC KIDNEY TRANSPLANTATION. *Clin Transplant*, 15:221–227.
84. Ganji, M. R., and A. Harririan. 2012. CHRONIC ALLOGRAFT DYSFUNCTION: MAJOR CONTRIBUTING FACTORS. *Iran J Kidney Dis*, 6:88–93.
85. Sis, B., M. Mengel, M. Haas, R. B. Colvin, P. F. Halloran et al. 2010. BANFF '09 MEETING REPORT: ANTIBODY MEDIATED GRAFT DETERIORATION AND IMPLEMENTATION OF BANFF WORKING GROUPS. *Am. J. Transplant*, 10:464–471.
86. Banasik, M., and M. Klinger. 2006. CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY--IMMUNOLOGIC AND NONIMMUNOLOGIC FACTORS. *Ann. Transplant*, 11:7–10.
87. Nankivell, B. J., R. J. Borrows, C. L.-S. Fung, P. J. O'Connell, R. D. M. Allen et al. 2003. THE NATURAL HISTORY OF CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY. *N. Engl. J. Med*, 349:2326–2333.
88. Jevnikar, A. M., and R. B. Mannon. 2008. LATE KIDNEY ALLOGRAFT LOSS: WHAT WE KNOW ABOUT IT, AND WHAT WE CAN DO ABOUT IT. *Clin. J. Am.*

89. Nankivell, B. J., and J. R. Chapman. 2006. CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY: CURRENT CONCEPTS AND FUTURE DIRECTIONS. *Transplantation*, 81:643–654.
90. Golbabaie, M., M. Kayedi, I. Najafi, M. R. Ganji, G. H. Naderi et al. 2001. CHRONIC RENAL ALLOGRAFT DYSFUNCTION: IMMUNOLOGIC AND NONIMMUNOLOGIC RISK FACTORS. *Transplant. Proc*, 33:2691–2692.
91. Keane, N. M., P. Price, S. F. Stone, M. John, R. J. Murray et al. 2000. ASSESSMENT OF IMMUNE FUNCTION BY LYMPHOPROLIFERATION UNDERESTIMATES LYMPHOCYTE FUNCTIONAL CAPACITY IN HIV PATIENTS TREATED WITH HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 16:1991–1996.
92. Smith, J. G., X. Liu, R. M. Kaufhold, J. Clair, and M. J. Caulfield. 2001. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GAMMA INTERFERON ELISPOT ASSAY FOR QUANTITATION OF CELLULAR IMMUNE RESPONSES TO VARICELLA-ZOSTER VIRUS. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*, 8:871–879.
93. Hoyer, K. K., H. Dooms, L. Barron, and A. K. Abbas. 2008. INTERLEUKIN-2 IN THE DEVELOPMENT AND CONTROL OF INFLAMMATORY DISEASE. *Immunol. Rev*, 226:19–28.
94. Gaffen, S. L., and K. D. Liu. 2004. OVERVIEW OF INTERLEUKIN-2 FUNCTION, PRODUCTION AND CLINICAL APPLICATIONS. *Cytokine*, 28:109–123.
95. Xu, D., M. L. Alegre, S. S. Varga, A. L. Rothermel, A. M. Collins et al. 2000. IN VITRO CHARACTERIZATION OF FIVE HUMANIZED OKT3 EFFECTOR FUNCTION VARIANT ANTIBODIES. *Cell. Immunol*, 200:16–26.
96. Norman, D. J. 1995. MECHANISMS OF ACTION AND OVERVIEW OF OKT3. *Ther Drug Monit*, 17:615–620.
97. Sgro, C. 1995. SIDE-EFFECTS OF A MONOCLONAL ANTIBODY, MUROMONAB CD3/ORTHOCLONE OKT3: BIBLIOGRAPHIC REVIEW. *Toxicology*, 105:23–29.
98. Popma, S. H., D. E. Griswold, and L. Li. 2005. ANTI-CD3 ANTIBODIES OKT3 AND HOKT3GAMMA1 (ALA-ALA) INDUCE PROLIFERATION OF T CELLS BUT

IMPAIR EXPANSION OF ALLOREACTIVE T CELLS; ASPECIFC T CELL PROLIFERATION INDUCED BY ANTI-CD3 ANTIBODIES CORRELATES WITH IMPAIRED EXPANSION OF ALLOREACTIVE T CELLS. *Int. Immunopharmacol*, 5:155–162.

99. Chatenoud, L., and J. A. Bluestone. 2007. CD3-SPECIFIC ANTIBODIES: A PORTAL TO THE TREATMENT OF AUTOIMMUNITY. *Nat. Rev. Immunol*, 7:622–632.
100. Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1970. THE STRUCTURE OF A PHYTOHEMAGGLUTININ RECEPTOR SITE FROM HUMAN ERYTHROCYTES. *J. Biol. Chem*, 245:2536–2545.
101. Billiau, A., and P. Matthys. 2009. INTERFERON-GAMMA: A HISTORICAL PERSPECTIVE. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20:97–113.
102. Wheelock, E. F. 1965. INTERFERON-LIKE VIRUS-INHIBITOR INDUCED IN HUMAN LEUKOCYTES BY PHYTOHEMAGGLUTININ. *Science*, 149:310–311.
103. Herzenberg, L. A., D. Parks, B. Sahaf, O. Perez, M. Roederer et al. 2002. THE HISTORY AND FUTURE OF THE FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER AND FLOW CYTOMETRY: A VIEW FROM STANFORD. *Clin. Chem*, 48:1819–1827.
104. McNeill, L., R. L. Cassady, S. Sarkardei, J. C. Cooper, G. Morgan et al. 2004. CD45 ISOFORMS IN T CELL SIGNALLING AND DEVELOPMENT. *Immunol. Lett*, 92:125–134.
105. Steensma, D. P., M. Timm, and T. E. Witzig. 2003. FLOW CYTOMETRIC METHODS FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF APOPTOSIS. *Methods Mol. Med*, 85:323–332.
106. Czerkinsky, C. C., L. A. Nilsson, H. Nygren, O. Ouchterlony, and A. Tarkowski. 1983. A SOLID-PHASE ENZYME-LINKED IMMUNOSPOT (ELISPOT) ASSAY FOR ENUMERATION OF SPECIFIC ANTIBODY-SECRETING CELLS. *J. Immunol. Methods*, 65:109–121.
107. Sedgwick, J. D., and P. G. Holt. 1983. A SOLID-PHASE IMMUNOENZYMATIC TECHNIQUE FOR THE ENUMERATION OF SPECIFIC ANTIBODY-SECRETING CELLS. *J. Immunol. Methods*, 57:301–309.

108. Tanguay, S., and J. J. Killion. 1994. DIRECT COMPARISON OF ELISPOT AND ELISA-BASED ASSAYS FOR DETECTION OF INDIVIDUAL CYTOKINE-SECRETING CELLS. *Lymphokine Cytokine Res*, 13:259–263.
109. Lehmann, P. V., and W. Zhang. 2012. UNIQUE STRENGTHS OF ELISPOT FOR T CELL DIAGNOSTICS. *Methods Mol. Biol*, 792:3–23.
110. Scheibenbogen, C., P. Romero, L. Rivoltini, W. Herr, A. Schmittel et al. 2000. QUANTITATION OF ANTIGEN-REACTIVE T CELLS IN PERIPHERAL BLOOD BY IFNGAMMA-ELISPOT ASSAY AND CHROMIUM-RELEASE ASSAY: A FOUR-CENTRE COMPARATIVE TRIAL. *J. Immunol. Methods*, 244:81–89.
111. Slota, M., J.-B. Lim, Y. Dang, and M. L. Disis. 2011. ELISPOT FOR MEASURING HUMAN IMMUNE RESPONSES TO VACCINES. *Expert Rev Vaccines*, 10:299–306.
112. Danziger-Isakov, L., L. Cherkassky, H. Siegel, M. McManamon, K. Kramer et al. 2010. EFFECTS OF INFLUENZA IMMUNIZATION ON HUMORAL AND CELLULAR ALLOREACTIVITY IN HUMANS. *Transplantation*, 89:838–844.
113. Boaz, M. J., P. Hayes, T. Tarragona, L. Seamons, A. Cooper et al. 2009. CONCORDANT PROFICIENCY IN MEASUREMENT OF T-CELL IMMUNITY IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS VACCINE CLINICAL TRIALS BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL AND ENZYME-LINKED IMMUNOSPOT ASSAYS IN LABORATORIES FROM THREE CONTINENTS. *Clin. Vaccine Immunol*, 16:147–155.
114. Streeck, H., N. Frahm, and B. D. Walker. 2009. THE ROLE OF IFN-GAMMA ELISPOT ASSAY IN HIV VACCINE RESEARCH. *Nat Protoc*, 4:461–469.
115. Tassignon, J., W. Burny, S. Dahmani, L. Zhou, P. Stordeur et al. 2005. MONITORING OF CELLULAR RESPONSES AFTER VACCINATION AGAINST TETANUS TOXOID: COMPARISON OF THE MEASUREMENT OF IFN-GAMMA PRODUCTION BY ELISA, ELISPOT, FLOW CYTOMETRY AND REAL-TIME PCR. *J. Immunol. Methods*, 305:188–198.
116. Lion, E., E. L. J. M. Smits, Z. N. Berneman, and V. F. I. van Tendeloo. 2009. QUANTIFICATION OF IFN-GAMMA PRODUCED BY HUMAN PURIFIED NK CELLS FOLLOWING TUMOR CELL STIMULATION: COMPARISON OF THREE

IFN-GAMMA ASSAYS. *J. Immunol. Methods*, 350:89–96.

117. Allmendinger, J., F. Paradies, M. Kamprad, T. Richter, B. Pustowoit et al. 2010. DETERMINATION OF RUBELLA VIRUS-SPECIFIC CELL-MEDIATED IMMUNITY USING IFN GAMMA-ELISPOT. *J. Med. Virol*, 82:335–340.
118. Lienhardt, C., K. Fielding, A. A. Hane, A. Niang, C. T. Ndao et al. 2010. EVALUATION OF THE PROGNOSTIC VALUE OF IFN-GAMMA RELEASE ASSAY AND TUBERCULIN SKIN TEST IN HOUSEHOLD CONTACTS OF INFECTIOUS TUBERCULOSIS CASES IN SENEGAL. *PLoS ONE*, 5:e10508.
119. Lalvani, A. 2007. DIAGNOSING TUBERCULOSIS INFECTION IN THE 21ST CENTURY: NEW TOOLS TO TACKLE AN OLD ENEMY. *Chest*, 131:1898–1906.
120. Santín Cerezales, M., and J. D. Benítez. 2011. DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS INFECTION USING INTERFERON- γ -BASED ASSAYS. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*, 29:26–33.
121. Britten, C. M., C. Gouttefangeas, M. J. P. Welters, G. Pawelec, S. Koch et al. 2008. THE CIMT-MONITORING PANEL: A TWO-STEP APPROACH TO HARMONIZE THE ENUMERATION OF ANTIGEN-SPECIFIC CD8+ T LYMPHOCYTES BY STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ASSAYS. *Cancer Immunol. Immunother*, 57:289–302.
122. Jochems, C.E., J.B. van der Valk, F.R. Stafleu and V. Baumans. 2003. THE USE OF FETAL BOVINE SERUM: ETHICAL OR SCIENTIFIC PROBLEM. *Alternatives to Laboratory Animals*, 30:219-27.
123. Ommen, E. S., J. A. Winston, and B. Murphy. 2006. MEDICAL RISKS IN LIVING KIDNEY DONORS: ABSENCE OF PROOF IS NOT PROOF OF ABSENCE. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1:885–895.
124. Nickel, P., F. Presber, G. Bold, D. Biti, C. Schönemann et al. 2004. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT SPOT ASSAY FOR DONOR-REACTIVE INTERFERON-GAMMA-PRODUCING CELLS IDENTIFIES T-CELL PRESENSITIZATION AND CORRELATES WITH GRAFT FUNCTION AT 6 AND 12 MONTHS IN RENAL-TRANSPLANT RECIPIENTS. *Transplantation*, 78:1640–1646.
125. Lindström, S. 2012. FLOW CYTOMETRY AND MICROSCOPY AS MEANS OF

STUDYING SINGLE CELLS: A SHORT INTRODUCTONAL OVERVIEW.
Methods Mol. Biol., 853:13–15.

126. Heeger, P. S., N. S. Greenspan, S. Kuhlenschmidt, C. Dejelo, D. E. Hricik et al. 1999. PRETRANSPLANT FREQUENCY OF DONOR-SPECIFIC, IFN-GAMMA-PRODUCING LYMPHOCYTES IS A MANIFESTATION OF IMMUNOLOGIC MEMORY AND CORRELATES WITH THE RISK OF POSTTRANSPLANT REJECTION EPISODES. *J. Immunol.*, 163:2267–2275.
127. Nickel, P., F. Presber, G. Bold, D. Biti, C. Schönemann et al. 2004. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT SPOT ASSAY FOR DONOR-REACTIVE INTERFERON-GAMMA-PRODUCING CELLS IDENTIFIES T-CELL PRESENSITIZATION AND CORRELATES WITH GRAFT FUNCTION AT 6 AND 12 MONTHS IN RENAL-TRANSPLANT RECIPIENTS. *Transplantation*, 78:1640–1646.
128. Gebauer, B. S., D. E. Hricik, A. Atallah, K. Bryan, J. Riley et al. 2002. EVOLUTION OF THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT SPOT ASSAY FOR POST-TRANSPLANT ALLOREACTIVITY AS A POTENTIALLY USEFUL IMMUNE MONITORING TOOL. *Am. J. Transplant*, 2:857–866.
129. Näther, B. J., P. Nickel, G. Bold, F. Presber, C. Schönemann et al. 2006. MODIFIED ELISPOT TECHNIQUE--HIGHLY SIGNIFICANT INVERSE CORRELATION OF POST-TX DONOR-REACTIVE IFNGAMMA-PRODUCING CELL FREQUENCIES WITH 6 AND 12 MONTHS GRAFT FUNCTION IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS. *Transpl. Immunol*, 16:232–237.
130. Tanaka, M., Y. Okamoto, T. Fukui, and T. Masuzawa. 2012. SUPPRESSION OF INTERLEUKIN 17 PRODUCTION BY BRAZILIAN PROPOLIS IN MICE WITH COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS. *Inflammopharmacology*, 20:19–26.
131. Seetharam, A. B., B. B. Borg, V. Subramanian, W. C. Chapman, J. S. Crippin et al. 2011. TEMPORAL ASSOCIATION BETWEEN INCREASED VIRUS-SPECIFIC TH17 RESPONSE AND SPONTANEOUS RECOVERY FROM RECURRENT HEPATITIS C IN A LIVER TRANSPLANT RECIPIENT. *Transplantation*, 92:1364–1370.
132. Ranjbar, M., G. Solgi, M. Mohammadnia, B. Nikbin, G. Pourmand et al. 2012. REGULATORY T-CELL SUBSET ANALYSIS AND PROFILE OF INTERLEUKIN

- (IL)-10, IL-17 AND INTERFERON-GAMMA CYTOKINE-PRODUCING CELLS IN KIDNEY ALLOGRAFT RECIPIENTS WITH DONOR CELLS INFUSION. *Clinical and experimental nephrology*, 16:636–646.
133. Zhang, W., R. Caspell, A. Y. Karulin, M. Ahmad, N. Haicheur et al. 2009. ELISPOT ASSAYS PROVIDE REPRODUCIBLE RESULTS AMONG DIFFERENT LABORATORIES FOR T-CELL IMMUNE MONITORING-EVEN IN HANDS OF ELISPOT-INEXPERIENCED INVESTIGATORS. *J Immunotoxicol*, 6:227–234.
134. Conrad, S., S. Ritter, C. Fournier, and K. Nixdorff. 2009. DIFFERENTIAL EFFECTS OF IRRADIATION WITH CARBON IONS AND X-RAYS ON MACROPHAGE FUNCTION. *J. Radiat. Res.*, 50:223–231.
135. Rödel, F., B. Frey, U. Gaipl, L. Keilholz, C. Fournier et al. 2012. MODULATION OF INFLAMMATORY IMMUNE REACTIONS BY LOW-DOSE IONIZING RADIATION: MOLECULAR MECHANISMS AND CLINICAL APPLICATION. *Curr. Med. Chem.*, 19:1741–1750.
136. Deschavanne, P. J., and B. Fertil. 1996. A REVIEW OF HUMAN CELL RADIOSENSITIVITY IN VITRO. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 34:251–266.
137. Bestard, O., J. M. Cruzado, M. Lucia, E. Crespo, L. Casis et al. 2013. PROSPECTIVE ASSESSMENT OF ANTIDONOR CELLULAR ALLOREACTIVITY IS A TOOL FOR GUIDANCE OF IMMUNOSUPPRESSION IN KIDNEY TRANSPLANTATION. *Kidney int*, 84:1226-1236.
138. Koscielska-Kasprzak, K., D. Drulis-Fajdasz, D. Kaminska, O. Mazanowska, M. Krajewska et al. 2009. PRETRANSPLANTATION CELLULAR ALLOREACTIVITY IS PREDICTIVE OF ACUTE GRAFT REJECTION AND 1-YEAR GRAFT FUNCTION IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS. *Transplantation Proceedings*, 41:3006–3008.
139. Loverre, A., C. Divella, G. Castellano, T. Tataranni, G. Zaza et al. 2011. T HELPER 1, 2 AND 17 CELL SUBSETS IN RENAL TRANSPLANT PATIENTS WITH DELAYED GRAFT FUNCTION. *Transplant International*, 24:233–242.
140. Loong, C.-C., H.-G. Hsieh, W.-Y. Lui, A. Chen, and C.-Y. Lin. 2002. EVIDENCE FOR THE EARLY INVOLVEMENT OF INTERLEUKIN 17 IN HUMAN AND EXPERIMENTAL RENAL ALLOGRAFT REJECTION. *J. Pathol*, 197:322–332.

141. Hricik, D. E., V. Rodriguez, J. Riley, K. Bryan, M. Tary-Lehmann et al. 2003. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT SPOT (ELISPOT) ASSAY FOR INTERFERON-GAMMA INDEPENDENTLY PREDICTS RENAL FUNCTION IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS. *Am. J. Transplant*, 3:878–884.
142. Li, B., C. Hartono, R. Ding, V. K. Sharma, R. Ramaswamy et al. 2001. NONINVASIVE DIAGNOSIS OF RENAL-ALLOGRAFT REJECTION BY MEASUREMENT OF MESSENGER RNA FOR PERFORIN AND GRANZYME B IN URINE. *N. Engl. J. Med.*, 344:947–954.
143. Poggio, E. D., M. Clemente, J. Riley, M. Roddy, N. S. Greenspan et al. 2004. ALLOREACTIVITY IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS WITH AND WITHOUT CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY. *J. Am. Soc. Nephrol*, 15:1952-1960.
144. Najafian, N., A. D. Salama, E. V. Fedoseyeva, G. Benichou, and M. H. Sayegh. 2001. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT SPOT ASSAY ANALYSIS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE REACTIVITY TO DONOR HLA-DR PEPTIDES: POTENTIAL NOVEL ASSAY FOR PREDICTION OF OUTCOMES FOR RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS. *J. Am. Soc. Nephrol*, 13: 252-259.
145. Choi, J. Y., O. J. Kwon, and C. M. Kang. 2012. THE EFFECT OF DONOR-RECIPIENT RELATIONSHIP ON LONG-TERM OUTCOMES OF LIVING RELATED DONOR RENAL TRANSPLANTATION. *Transplant. Proc*, 44:257–260.
146. Sayegh, M. H., N. A. Fine, J. L. Smith, H. G. Rennke, E. L. Milford et al. 1991. IMMUNOLOGIC TOLERANCE TO RENAL ALLOGRAFTS AFTER BONE MARROW TRANSPLANTS FROM THE SAME DONORS. *Ann. Intern. Med.*, 114:954–955.
147. Kawai, T., A. B. Cosimi, and D. H. Sachs. 2011. PRECLINICAL AND CLINICAL STUDIES ON THE INDUCTION OF RENAL ALLOGRAFT TOLERANCE THROUGH TRANSIENT MIXED CHIMERISM. *Curr Opin Organ Transplant*, 16:366–371.
148. Scandling, J. D., S. Busque, S. Dejbakhsh-Jones, C. Benike, M. T. Millan et al. 2008. TOLERANCE AND CHIMERISM AFTER RENAL AND HEMATOPOIETIC-CELL TRANSPLANTATION. *N. Engl. J. Med.*, 358:362–368.

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Banff-Klassifikation der akuten T-Zell vermittelten Rejektionen.....	13
Tab. 1.2	Banff-Klassifikation der chronischen Rejektionen.....	14
Tab. 2.1	Zeitpunkte der Blutentnahmen.....	16
Tab. 2.2	PBMC-Konzentrationen für die unterschiedlichen Näpfe.....	26
Tab. 2.3	Einstellungen des Fluorospot-Readers.....	28
Tab. 3.1	Charakteristika der Patienten.....	29
Tab. 3.2	HLA-Antigen-spezifische Charakteristika der Patienten.....	30
Tab. 3.3	Medikamentöse Therapieschemata.....	32
Tab. 3.4	Zellkonzentrationen der Vorversuche im IFN- γ -Elispot.....	34
Tab. 3.5	Bestrahlung in den Vorversuchen des IFN- γ -Elispot.....	34
Tab. 3.6	IL-2-Konzentrationen in den Vorversuchen des IFN- γ -Elispot.....	35
Tab. 3.7	Spotanzahlen der Vorversuche im IFN- γ -Elispot.....	35
Tab. 3.8	Einstellung der Stimulanz im IL-17-Elispot.....	36
Tab. 3.9	Einstellung der Zellkonzentration im IL-17-Elispot.....	36
Tab. 3.10	Bestrahlung in den Vorversuchen im IL-17-Elispot.....	36
Tab. 3.11	Spotanzahlen der Vorversuche im IL-17-Elispot.....	36
Tab. 3.12	Einfluss der γ -Strahlung auf die Zellvitalität.....	38
Tab. 3.13	Vergleich der Spotanzahlen von Empfänger und Buffy-Coats.....	39
Tab. 3.14	Erläuterung der Patientenkodierung.....	39
Tab. 3.15	Unterschiede der Spotanzahlen in Bezug auf das HLA-Mismatch	49

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Darstellung der Entwicklung verschiedener T-Zellen.....	03
Abb. 1.2	Zeitliche Einordnung der Erreger nach Transplantation.....	10
Abb. 3.1	Vergleich unterschiedlicher Medien im IFN- γ -Elispot.....	37
Abb. 3.2	Mediane der Spender und Empfänger im unstimulierten IFN- γ -Elispot.....	40
Abb. 3.3	Mediane der Spender und Empfänger im stimulierten IFN- γ -Elispot.....	41
Abb. 3.4	Mediane der PBMC (Spender) im IFN- γ -Elispot.....	41
Abb. 3.5	Mediane der PBMC (Spender) unter IL-2-Stimulation im IFN- γ -Elispot.....	42
Abb. 3.6	Mediane und mittlere Abweichungen der Empfänger im IFN- γ -Elispot.....	43
Abb. 3.7	Mediane und mittlere Abweichungen der unbestrahlten MLR im IFN- γ - Elispot.....	44
Abb. 3.8	Mediane und mittlere Abweichungen der bestrahlten MLR im IFN- γ - Elispot	44
Abb. 3.9	Mediane der Spender und Empfänger unter OKT3-Stimulation im IL-17- Elispot.....	45
Abb. 3.10	Mediane der PBMC (Spender) unter OKT3-Stimulation im IL-17-Elispot...	46
Abb. 3.11	Mediane und mittlere Abweichungen der Empfänger im IL-17-Elispot.....	47
Abb. 3.12	Mediane und mittlere Abweichungen der unbestrahlten MLR im IL-17- Elispot	47
Abb. 3.13	Mediane und mittlere Abweichungen der bestrahlten MLR im IL-17- Elispot	48
Abb. 4.1	Gegenüberstellung der Mediane und mittleren Abweichungen im IFN- γ - Elispot	55
Abb. 4.2	Gegenüberstellung der Mediane und mittleren Abweichungen im IL-17- Elispot	56
Abb. 4.3	Serumkreatininmolarität im Verlauf.....	59
Abb. 4.4	Überlebensrate in Abhängigkeit zur Familienkonstellation.....	61

10 Erklärung über die eigenständige Verfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, Conrad Grehn, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Ort, Datum

Unterschrift

11 Lebenslauf

Name: Conrad Maria Tobias Grehn
Adresse: Jahnallee 67, 04177 Leipzig
Geburtsdatum: 12. Dezember 1983
Geburtsort : Freiburg im Breisgau
Familienstand : feste Lebenspartnerschaft
Kinder: Janosch Kraul (7 Jahre); Frederic Kraul (3 Jahre)
Nationalität : deutsch

Hochschulreife : Abitur am Wirsberg-Gymnasium Würzburg, 2003

Auslandserfahrung: halbjähriges soziales Praktikum (08/2003 - 02/2004) in San Vicente de Nicoya, Costa Rica (Aufbauhilfe eines Museums sowie Englischunterricht an der dortigen Grundschule)

Studium: 2004-2006 vier Semester an der Semmelweis Universität Budapest, Ungarn, mit erfolgreichem Physikum
2006-2007 zwei Semester an der Universitätsklinik Charité, Berlin
2007-2011 acht Semester an der Universität Leipzig mit erfolgreichem Staatsexamen

2011-2012: Doktorand am Institut für klinische Immunologie an der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

seit 2012: Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin, Schmerztherapie und Palliativmedizin am Sana Klinikum Leipziger Land in Borna

Sprachen: deutsch, englisch und spanisch in Wort und Schrift

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei zahlreichen Personen bedanken, die meine Arbeit gefördert und mich selbst motiviert haben.

Zunächst gilt der Dank meinem Doktorvater Professor Dr. Ulrich Sack, der trotz vollgestopftem Terminplan immer Zeit hatte und meine Arbeit durch viele Anregungen bereichert hat.

Weiter gilt mein besonderer Dank den mit mir im Labor tätigen Personen Katrin Bauer, Dr. Franka Kahlenberg, Heike Knaak, Dr. Andreas Boldt und Dr. Stefan Borte, die mir seit meinem ersten Arbeitstag liebevoll alles Wichtige beibrachten und das Schiff meiner Doktorarbeit vor dem Kentern bewahrten.

Zudem danke ich PD Dr. Thomas Bartels und Dr. Hans-Michael Hau aus der chirurgischen Fakultät der Universität Leipzig, Dr. Karl Weigand aus der urologischen Fakultät der Universität Halle/Saale und PD Dr. Gerald Schlaf aus dem Institut der medizinischen Immunologie Halle/Saale für die freundliche und hilfreiche Kooperation.

Zu guter Letzt gebührt ein großer Dank meinen Eltern für die ständige Hilfe, meinen beiden Söhnen Janosch und Frederic, die mir ein konzentriertes Arbeiten bei weniger Zeitangebot beigebracht haben und natürlich meiner Frau Swantje Kraul für die Kraft und Liebe, die sie mir täglich gibt.