

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expression profibrotischer Zytokine und
Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit von der
immunsuppressiven Erhaltungstherapie nach
Nierentransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Schneider
aus Neubrandenburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Budde
2. Prof. Dr. med. P. Neuhaus
3. Prof. Dr. med. M. Zeier

Datum der Promotion: 07. Dezember 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Terminale Niereninsuffizienz	6
1.1.1	Inzidenz und Prävalenz	6
1.1.2	Pathophysiologie	7
1.1.3	Therapiemöglichkeiten	7
1.2	Nierentransplantation	8
1.3	Chronische Transplantatnephropathie	9
1.3.1	Pathogenese	9
1.3.2	Klassifikation.....	11
1.4	Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1).....	14
1.4.1	Überblick.....	14
1.4.2	Struktur, Aktivierung und Rezeptoren	14
1.4.3	Funktion.....	15
1.4.4	Rolle bei der chronischen Transplantatnephropathie.....	16
1.5	Endothelin.....	16
1.5.1	Überblick.....	16
1.5.2	Struktur, Aktivierung und Rezeptoren	17
1.5.3	Funktion.....	18
1.6	Immunsuppressiva	19
1.6.1	Calcium-Calcineurin-Signalweg	19
1.6.2	Calcineurin-Inhibitoren (CNI).....	20
1.6.3	Cyclosporin A	21
1.6.4	Monitoring von Cyclosporin A.....	22
1.6.5	Tacrolimus / FK 506	22
1.6.6	Monitoring von Tacrolimus / FK 506.....	23
1.6.7	Nephrotoxizität von Calcineurin-Inhibitoren	23
1.6.8	Mycophenolatmofetil (MMF).....	25
1.6.9	Monitoring von MMF.....	26
1.6.10	Rapamycin / Sirolimus.....	27
1.6.11	Monitoring von Rapamycin / Sirolimus.....	28
1.7	Herleitung der Aufgabenstellung	29
2	Patienten, Material und Methoden.....	31
2.1	Patienten	31
2.2	Materialien.....	31
2.2.1	Fertigprodukte	31
2.2.2	Lösungen und Puffer	32
2.2.3	Chemikalien.....	32

2.2.4	Antikörper	33
2.2.5	Glas- und Plastikwaren	33
2.2.6	Geräte.....	34
2.3	Methoden.....	34
2.3.1	Gewinnung der Proben	34
2.3.2	Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation	35
2.3.3	MTT-Assay zur Messung der Lymphozytenproliferation.....	36
2.3.3.1	Prinzip.....	36
2.3.3.2	Durchführung.....	36
2.3.4	Humaner TGF- β 1 ELISA.....	37
2.3.4.1	Bedeutung der Blutentnahmetechnik für die Messung der TGF- β -Konzentration im Blut.....	37
2.3.4.2	Prinzip.....	37
2.3.4.3	Aktivierung von TGF- β 1	38
2.3.4.4	Durchführung.....	39
2.3.4.5	Kalkulation der Ergebnisse.....	40
2.3.5	Endothelin (1-21) ELISA.....	40
2.3.5.1	Prinzip.....	40
2.3.5.2	Durchführung.....	41
2.3.5.3	Kalkulation der Ergebnisse.....	42
2.4	Statistische Auswertung	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Demographische Daten.....	43
3.2	Immunsuppressive Therapie und Therapeutic Drug Monitoring (TDM).....	44
3.3	TGF- β 1-Konzentration im Plasma.....	45
3.4	TGF- β 1-Konzentration im Zellkulturüberstand.....	46
3.5	Lymphozytenproliferation	49
3.6	Endothelin-1-Konzentration im Plasma	51
3.7	Einfluss demographischer Faktoren.....	52
3.7.1	Univariate Analyse.....	52
3.7.2	Multiple lineare Regressionsanalyse.....	53
3.8	Klinischer Verlauf.....	55
3.8.1	Transplantatfunktion	55
3.8.2	Chronische Transplantatnephropathie	55
3.8.3	Transplantatüberleben	57
4	Diskussion	58
4.1	Konzeption.....	58
4.2	Blutentnahmetechnik.....	59

4.3	Führen Unterschiede in der immunsuppressiven Therapie zu unterschiedlichen TGF- β 1-/ET-1-Konzentrationen im Plasma?	60
4.4	Führen Unterschiede in der immunsuppressiven Therapie zu unterschiedlichen TGF- β 1-Konzentrationen im Überstand kultivierter T-Zellen?	62
4.5	Korreliert die Höhe der gemessenen Medikamentenspiegel mit der Höhe der TGF- β 1-/ET-1-Plasmakonzentrationen?	62
4.6	Korreliert die Höhe der messbaren Medikamentenspiegel mit der Höhe der TGF- β 1-Konzentration im Überstand?	63
4.7	Korrelieren die Dosierungen/Konzentrationen der immunsuppressiven Medikation oder die gemessenen TGF- β 1-Konzentrationen mit der messbaren Lymphozyten-proliferation?	64
4.8	Welchen Einfluss haben weitere Variablen auf die gemessenen Parameter?	64
4.9	Korrelieren die gemessenen TGF- β 1-/ET-1-Plasmakonzentrationen mit der Transplantatfunktion oder dem Transplantatüberleben?	66
4.10	Zusammenfassung	67
5	Literaturverzeichnis	68
6	Danksagung	80
7	Lebenslauf.....	81
8	Erklärung.....	82

1 Einleitung

1.1 Terminale Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz ist definiert durch eine anhaltende Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und die daraus resultierende Zunahme harnpflichtiger Substanzen im Serum ¹. In Abhängigkeit von der Ursache der Nierenerkrankung ist die chronische Niereninsuffizienz histologisch vor allem durch eine zunehmende Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Fibrose gekennzeichnet. Das Endstadium der chronischen Niereninsuffizienz ist die terminale Niereninsuffizienz, welche in der angloamerikanischen Literatur als End Stage Renal Disease (ESRD) bezeichnet wird ². Die terminale Niereninsuffizienz ist definiert durch eine GFR < 15 ml/min, entsprechend dem Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO) Stadium V ³. In diesem Stadium der Nierenerkrankung ist die Einleitung einer chronischen Nierenersatztherapie indiziert.

1.1.1 Inzidenz und Prävalenz

Die Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz in Deutschland beträgt ca. 1000 pro Mio. Einwohner, die Inzidenz ca. 190 pro Mio. Einwohner ⁴ mit stetig steigender Tendenz. Verantwortlich für die steigende Tendenz sind unter anderem die zunehmende Inzidenz des Diabetes mellitus, die zunehmende Lebenserwartung, die zunehmende Behandlung multimorbider Patienten sowie die geringere Mortalität durch Komorbidität. Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz sind vor allem die diabetische Nephropathie (ca. 30%), vaskuläre Nephropathien einschließlich der hypertensiven Nephropathie (15-20%), Glomerulopathien (15-20%), interstitielle Nephritiden (ca. 10%), sowie hereditäre Erkrankungen (z.B. Zystennieren) und Systemerkrankungen (z.B. Systemischer Lypus Erythematodes und Morbus Wegener) ⁵.

1.1.2 Pathophysiologie

Sowohl primäre als auch sekundäre Erkrankungen der Niere führen zu pathologischen Veränderungen in Bezug auf Nierenmorphologie und Nierenfunktion. Funktionell kommt es zu einer Einschränkung der Ausscheidungsfunktion für Wasser und harnpflichtige Substanzen, zu Störungen im Elektrolyt- und Säure-/Basenhaushalt, sowie zu Störungen der endokrinen Funktionen. Daraus resultiert eine Akkumulation von Stoffwechselendprodukten wie Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure, Hyperkaliämie und Hyperphosphatämie, metabolische Azidose sowie eine Volumenüberladung. Als typische Begleiterscheinungen der chronischen Niereninsuffizienz finden sich arterielle Hypertonie, Vitamin D-Mangel, Hypokalzämie, sekundärer Hyperparathyreoidismus, Knochenstoffwechselstörungen, Hyperphosphatämie, Hyperkaliämie sowie die renale Anämie durch Erythropoetinmangel². Zusätzlich kommt es im Rahmen der urämischen Stoffwechsellage zur Schädigung weiterer Organsysteme, die sich in Form von gastrointestinalen und neurologischen Beschwerden, Hautveränderungen, einer gestörten Immunkompetenz, einer urämischen Perikarditis und einer urämischen Blutungsneigung äußern können.

1.1.3 Therapiemöglichkeiten

Die konservative Therapie der chronischen Niereninsuffizienz besteht – unabhängig von der Ätiologie der Nierenerkrankung – aus der frühzeitigen und adäquaten Korrektur der unter 1.1.2 genannten Störungen. Darüber hinaus sind insbesondere die engmaschige Kontrolle und Behandlung einer arteriellen Hypertonie, die Senkung des intraglomerulären Druckes, die Restriktion der Proteinzufuhr sowie die Vermeidung von Noxen wie Nikotin, Kontrastmittel und potentiell nephrotoxischen Medikamenten weitere wichtige Bausteine der Therapie. Bei progredienter Verschlechterung der Nierenfunktion ist es außerdem wichtig, den Patienten rechtzeitig über die verschiedenen Formen der Nierenersatztherapie aufzuklären. Prinzipiell stehen dem Patienten drei

Möglichkeiten der Nierenersatztherapie zur Auswahl: die Hämodialyse (HD), die Peritonealdialyse (PD) und die Nierentransplantation (NTx). Zum Stichtag 31.12.04 befanden sich in Deutschland insgesamt 82305 Patienten an chronischer Nierenersatztherapie. Von diesen Patienten wurden 71% mit Hämodialyse und 3% mit Peritonealdialyse behandelt, während 26% ein funktionierendes Transplantat hatten. Im gleichen Jahr befanden sich ca. 9300 Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation. Eine Transplantatniere erhielten 2478 Patienten im Jahr 2004, während im gleichen Jahr 2833 Patienten neu zur Nierentransplantation angemeldet wurden ⁴.

1.2 Nierentransplantation

Die erste gelungene Nierentransplantation beim Menschen mit Langzeitüberleben des Transplantats wurde 1954 bei eineiigen Zwillingen durch Joseph Murray in Boston durchgeführt ⁶. Seitdem hat die Transplantationsmedizin eine rasante Entwicklung erlebt. Die Transplantation von Nieren und anderen parenchymatösen Organen stellt heutzutage ein Standardverfahren der Medizin dar. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Nierentransplantation sowohl in Bezug auf die Lebenserwartung als auch in Bezug auf die Lebensqualität die optimale Therapieoption für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz darstellt ^{7,8}.

Trotz großer Anstrengungen ist es bis heute nicht gelungen, die Wartezeit auf eine Transplantatniere entscheidend zu verkürzen. Durch intensive Aufklärungsarbeit konnte zwar die Anzahl an Lebendspenden erhöht werden, seit mehreren Jahren ist jedoch eine Stagnation bei der Anzahl von Leichennierentransplantationen festzustellen. So ist die Anzahl der Nierentransplantationen in Deutschland in den letzten 10 Jahren nur um ca. 16,5% angestiegen [von 2128 (1995) auf 2478 (2004)] ⁴. Im gleichen Zeitraum stieg jedoch die Anzahl der Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation um 20,8% an. Nicht zuletzt aus diesem Grund muss es weiterhin eines der Hauptziele der Transplantationsmedizin sein, das Transplantatüberleben weiter zu verbessern. Durch die Einführung moderner Immunsuppressiva wie Cyclosporin A (CyA), Tacrolimus / FK 506, Mycophenolat Mofetil (MMF) und Rapamycin / Sirolimus

ist es gelungen, die Häufigkeit akuter Rejektionen zu senken und das Transplantatüberleben zu verbessern. In einer neueren Arbeit konnten Meier-Kriesche et al. zeigen, dass das mittlere Transplantatüberleben zwischen 1988 und 1995 um ca. 2 Jahre zugenommen hat ⁹. Dieser Effekt war allerdings hauptsächlich durch das verbesserte Transplantatüberleben nach Re-Transplantation, also Zweit- oder Dritt-Transplantation verursacht. Das Transplantatüberleben für Patienten nach der ersten Nierentransplantation hat sich demgegenüber in diesem Zeitraum nur um durchschnittlich 5 Monate verbessert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Überlebensvorteil von 5 Monaten bereits im ersten Jahr nach Nierentransplantation entsteht. Danach war das Transplantatüberleben nach Erst-Nierentransplantation im Jahre 1995 unverändert im Vergleich zum Jahre 1988.

1.3 Chronische Transplantatnephropathie

Die chronische Transplantatnephropathie (CAN) ist trotz intensiver Bemühungen ein noch nicht vollständig verstandenes Kapitel der modernen Medizin. Traditionell wurde die chronische Transplantatnephropathie als Folge von wiederholten akuten oder subakuten Abstoßungsreaktionen angesehen und daher auch als chronische Transplantatabstoßung bezeichnet. Aktuelle Erkenntnisse lassen jedoch den Ausdruck chronische Transplantatnephropathie angebrachter erscheinen, da neben immunologischen auch nicht-immunologische Faktoren eine wichtige Rolle spielen ¹⁰.

1.3.1 Pathogenese

Pathogenetisch verantwortlich für die zunehmende Fibrose der Transplantatniere sind immunologische und nicht-immunologische Faktoren ¹⁰. Immunologische Faktoren sind die anhaltende Abstoßungsreaktion gegen das Allotransplantat und das wiederholte Auftreten akuter Rejektionen. Bei den nicht-immunologischen Faktoren spielen vor allem das Spenderalter ¹¹, der

Ischämie-Reperfusionsschaden ¹², die arterielle Hypertonie ^{13, 14}, die Hyperlipidämie ¹⁵ und Infektionskrankheiten wie beispielsweise die CMV-Infektion / -Erkrankung ¹⁶ eine Rolle. Aus der aktuellen Literatur und aus der klinischen Erfahrung wird darüber hinaus deutlich, dass auch Bestandteile der immunsuppressiven Erhaltungstherapie selbst, insbesondere die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A ¹⁷⁻¹⁹ und Tacrolimus ²⁰ an der zunehmenden Fibrosierung der Transplantatniere beteiligt sind.

Die bei der CAN auftretende Fibrose ist auf ein gestörtes Verhältnis zwischen Synthese und Abbau von Kollagenen und Glykoproteinen zurückzuführen. Der Abbau befindet sich unter der Kontrolle von proteolytischen Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die wiederum durch eigene Inhibitoren (TIMPs = Tissue Inhibitor for Matrix Metalloproteinases) kontrolliert werden ²¹. Die pathologische extrazelluläre Matrixablagerung führt letztlich zur Glomerulosklerose und zur interstitiellen Fibrose und damit zum Verlust der Funktionsfähigkeit des Transplantats ²².

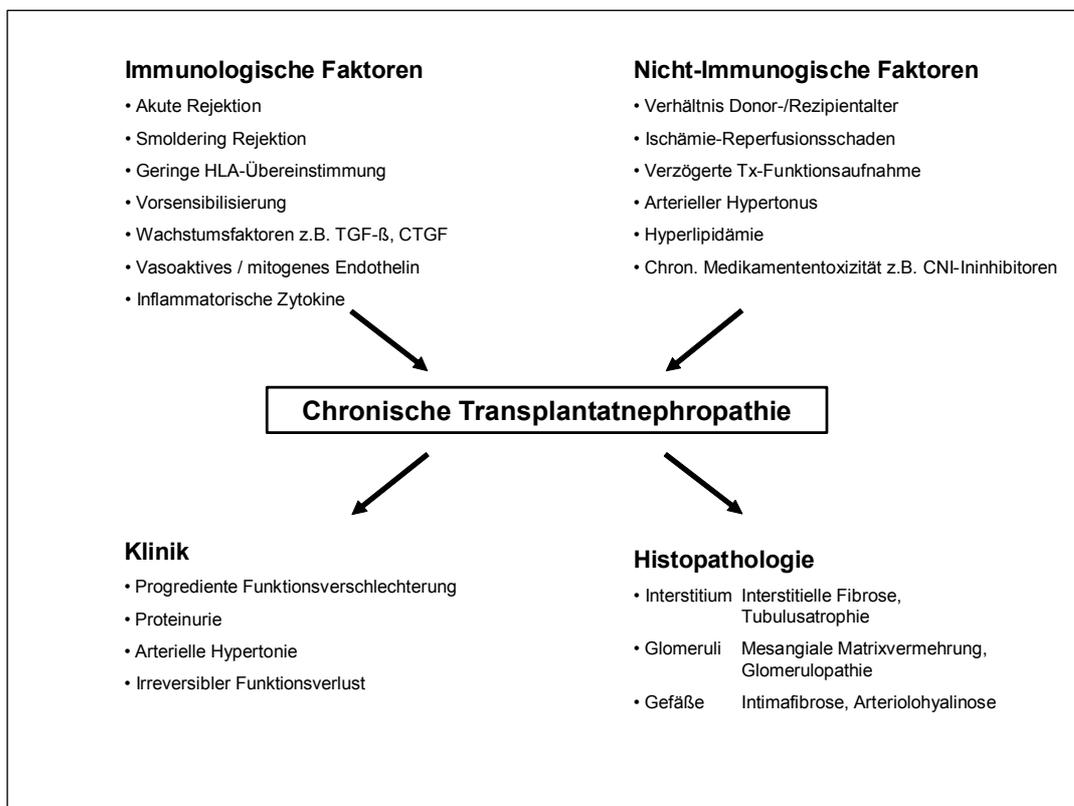


Abbildung 1: Dargestellt sind Risikofaktoren sowie klinische und histopathologische Merkmale der chronischen Transplantatnephropathie

1.3.2 Klassifikation

Die chronische Transplantatnephropathie ist durch den klinischen Verlauf und durch histopathologische Kriterien definiert. Klinisch kommt es zu einem progredienten Abfall der Transplantatnierenfunktion assoziiert mit einer arteriellen Hypertonie und einer – in Abhängigkeit vom glomerulären Befund – unterschiedlich ausgeprägten Proteinurie. Letztendlich münden diese Veränderungen in den irreversiblen Funktionsverlust der Transplantatniere.

Entsprechend der Banff-Klassifikation wird die chronische Transplantatnephropathie in drei Schweregrade eingeteilt (Grad I – III)²³. Zur Einteilung in diese drei Stadien werden folgende Strukturen herangezogen:

- Interstitium interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie
- Glomeruli Glomerulopathie und mesangiale Matrixvermehrung
- Gefäße Intimafibrose und Arteriolothyalinose

Derzeit bestehen nur unzureichende Möglichkeiten zur Früherkennung der chronischen Transplantatnephropathie. Die Nierenfunktion wird durch Bestimmung der Kreatininclearance und der Proteinurie beurteilt. Die Niere ist jedoch in der Lage, diese Parameter trotz fortschreitender struktureller Schädigung über relativ lange Zeit konstant zu halten. Somit zeigen die verfügbaren Screening-Parameter die Nierenschädigung erst zu einem relativ späten Zeitpunkt an. Histologisch dagegen lässt sich eine CAN bereits zu etwa 4% nach 3 Monaten, zu 12% nach 6 Monaten und zu 49% nach 12 Monaten postoperativ nachweisen²⁴. Trotz stabiler Funktion sind 2 Jahre nach Transplantation bereits bei über 60% aller Transplantate unspezifische Veränderungen wie Arteriolothyalinose, Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie histologisch nachweisbar²⁵.

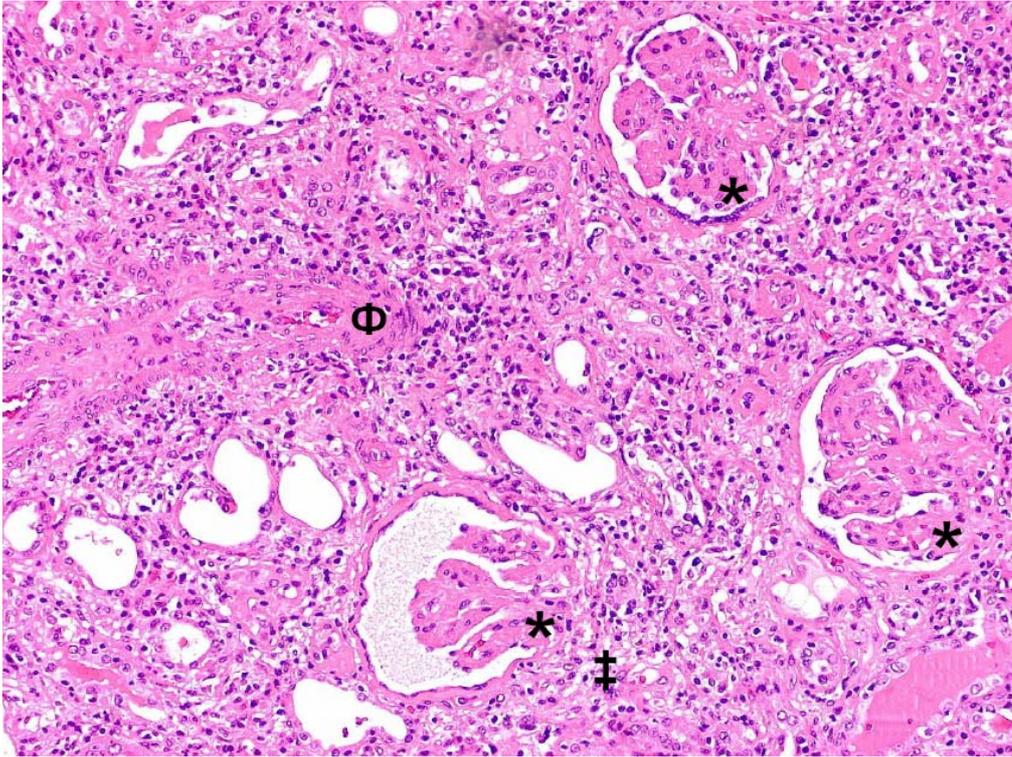


Abbildung 2: Chronische Transplantatnephropathie (HE-Färbung); Φ chronisch sklerosierende Transplantatvaskulopathie in Kombination mit florder Transplantatvaskulopathie, ‡ interstitielle Fibrose, Tubulusatrophie und chronische Entzündungsinfiltrate, * chronische glomeruläre Veränderungen wie Schlingenlobulierung, mesangiale Matrixvermehrung und Kapillarkollaps

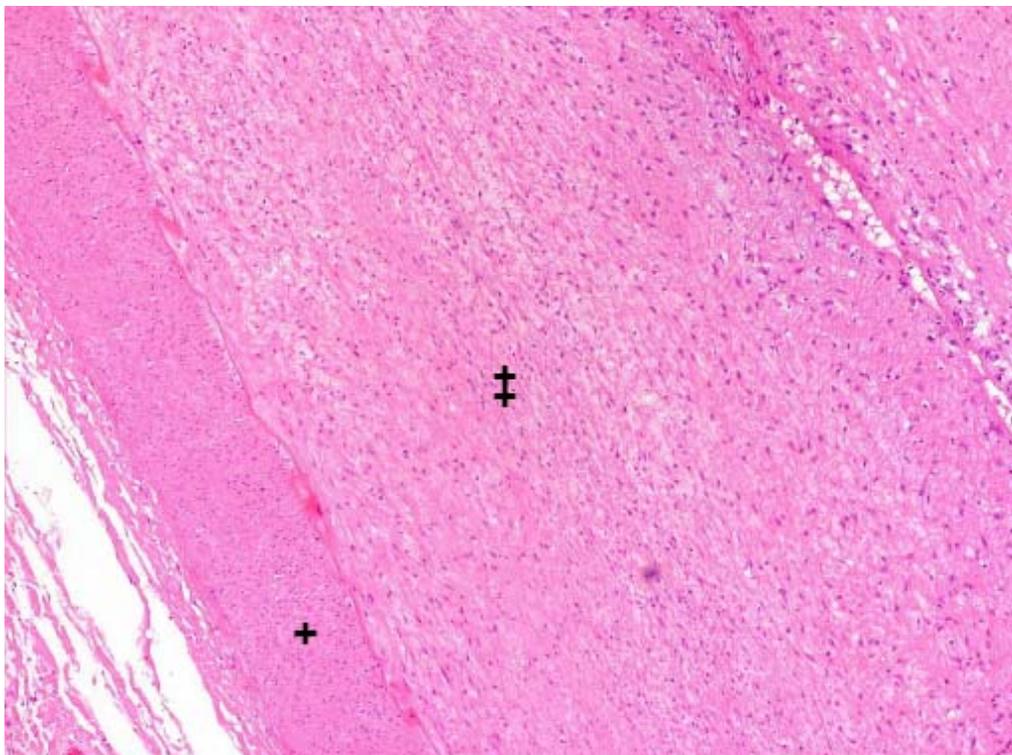


Abbildung 3: Transplantatnierenarterie (HE-Färbung); + Media, ‡ Stark verbreiterte Intima mit Fibrose und entzündlichen Infiltraten

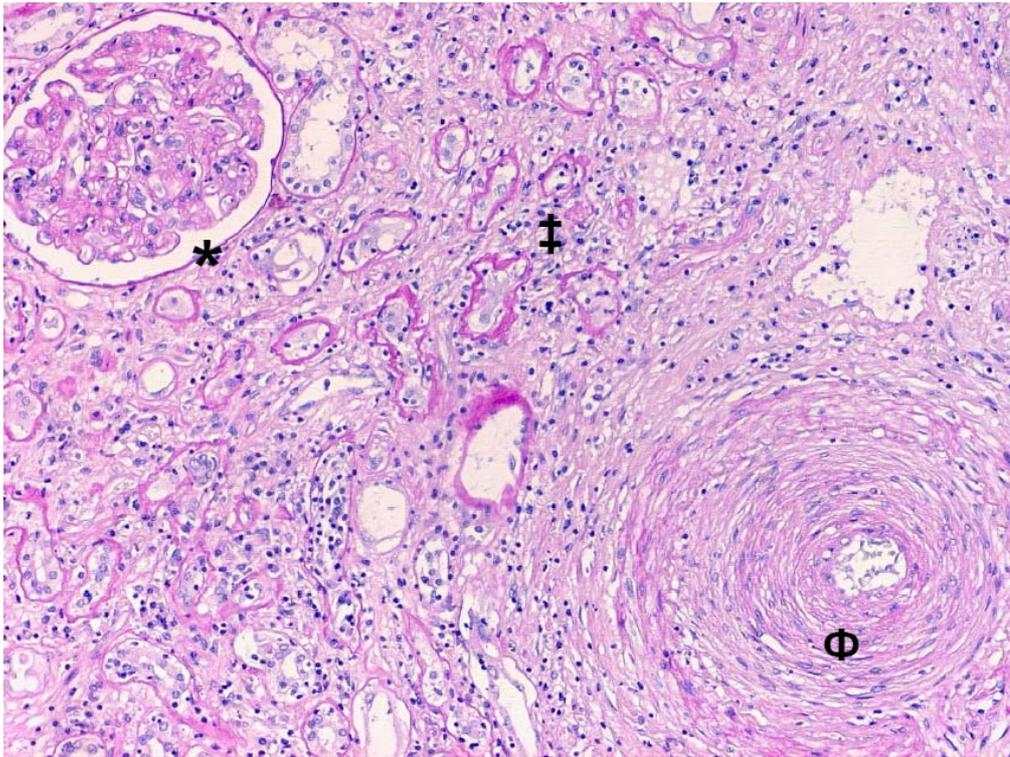


Abbildung 4: Chronische Transplantatnephropathie (PAS-Färbung); Φ chronisch sklerosierende Transplantatvaskulopathie, † interstitielle Fibrose und Einschluß atropher Tubuli, * chronische Transplantatglomerulopathie

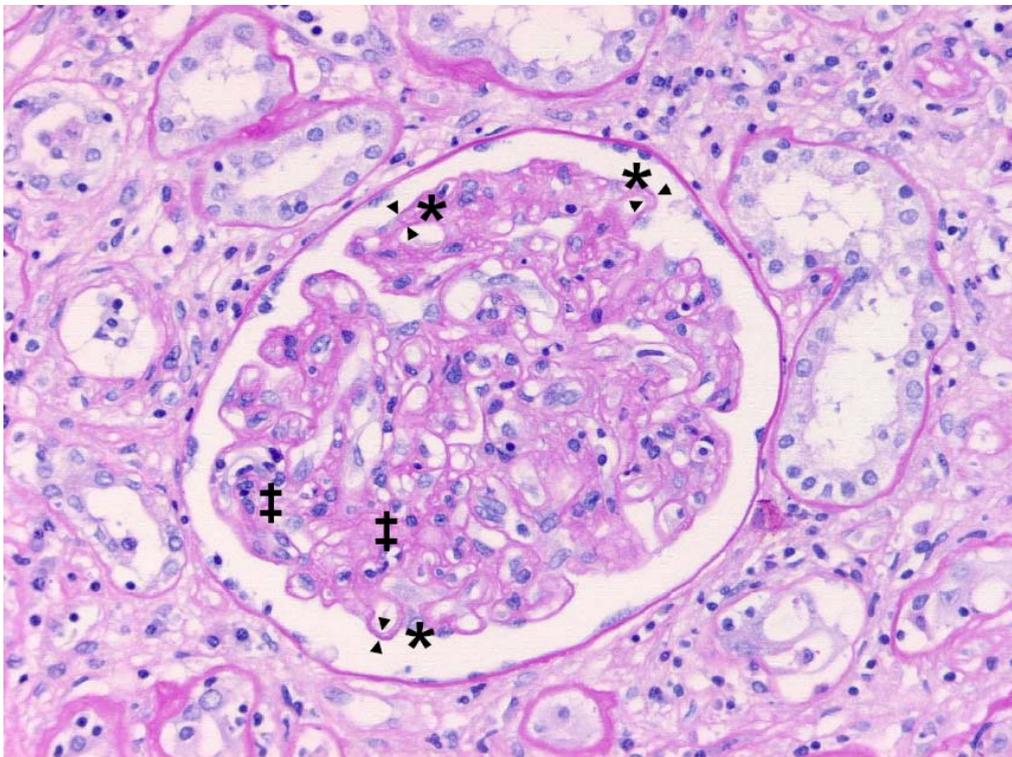


Abbildung 5: Chronische Transplantatglomerulopathie (PAS-Färbung); * periphere Basalmembranen mit Doppelkontur, Einengung kappillärer Lumina, † mesangiale Matrixvermehrung

1.4 Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)

1.4.1 Überblick

Die Transforming Growth Factors- β (TGF- β) gehören zur Familie der "Secreted growth factors" und wurden erstmalig zu Beginn der 80er Jahre beschrieben²⁶.²⁷ TGF- β ist der Prototyp der TGF- β -Superfamilie, zu welcher unter anderem auch Activine, Inhibine, das Anti-Müller Hormon und die "Bone Morphogenetic Proteins" (BMPs) gehören. Die TGF- β -Superfamilie wird als wichtiger Regulationsfaktor von Wachstum, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Migration angesehen²⁸. TGF- β selbst ist in der Lage über autokrine und parakrine Wege zu wirken²⁹ sowie zur Verstärkung der biologischen Wirksamkeit seine eigene Produktion zu induzieren³⁰. Bei Säugetieren sind drei verschiedene Isoformen (TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3) bekannt. TGF- β 1 ist das für den Menschen wichtigste und am besten untersuchte Peptid. Weitere Isoformen wurden bei Hühnern und Krallenfröschen beschrieben³¹. Beinahe alle Zelltypen des Körpers sind in der Lage TGF- β zu produzieren³². In Bezug auf die Niere kommt insbesondere den ortsständigen Mesangiumzellen sowie einwandernden Thrombo-, Mono- und Lymphozyten die größte Bedeutung zu³³.

1.4.2 Struktur, Aktivierung und Rezeptoren

Die drei verschiedenen Isoformen werden trotz ihrer großen Sequenzhomologie auf unterschiedlichen Genloci kodiert und exprimiert³¹. Jede TGF- β -Isoform wird als Teil eines großen Vorläufer-Moleküls synthetisiert, welches aus TGF- β und einem Propeptid, dem "latency-associated peptide" (LAP) besteht. Bevor es von der Zelle sezerniert wird, wird das TGF- β -Molekül vom LAP proteolytisch abgespalten. Nach der Proteolyse ist das TGF- β -Molekül weiterhin nicht-kovalent an LAP gebunden. Nach der Sekretion wird TGF- β in der extrazellulären Matrix als Komplex aus TGF- β , LAP und einem zusätzlichen Protein, dem "latent TGF- β binding protein" (LTBP), gespeichert. Dadurch wird die Bindung

von TGF- β an TGF- β -Rezeptoren verhindert und die biologische Aktivität kontrolliert. Die Freisetzung von TGF- β aus diesem Komplex wird durch verschiedene Faktoren, beispielsweise Thrombospondin und Plasmin, vermittelt. Da TGF- β und TGF- β -Rezeptoren in vielen Zelltypen vorkommen, ist diese Regulation entscheidend für die Wirkungsweise von TGF- β . Aktives TGF- β ist ein 25 kDa schweres, dimeres Molekül, welches aus zwei Untereinheiten besteht, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind ³⁴⁻³⁶.

Zur Vermittlung von TGF- β -spezifischen Effekten sind spezifische Membranrezeptoren notwendig, welche eine Signalkaskade auslösen, über die das Signal von der Zellmembran in den Zellkern geleitet wird. Dort steuert TGF- β die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und somit die Expression von Gensequenzen. Der TGF- β -Rezeptor (T β R) Typ III präsentiert TGF- β an den TGF- β -Rezeptor Typ II und moduliert die TGF- β -induzierte zelluläre Antwort. Die beiden TGF- β -Rezeptoren Typ I und Typ II besitzen Proteinkinasen im Bereich ihrer zytoplasmatischen Domänen, die die intrazelluläre Signalübertragung durch die Phosphorylierung von Smad-Proteinen initiieren. Smad-Proteine bilden eine Klasse von Transkriptionsfaktoren, die das Signal vom T β R zum Zellkern weiterleiten ^{33, 37-39}.

1.4.3 Funktion

TGF- β 1 erfüllt zahlreiche wichtige Funktionen im menschlichen Körper. Es ist in der Lage hämatopoetische, epitheliale und endotheliale Zellreihen in ihrer Proliferation zu inhibieren, hingegen werden mesenchymale Zellen eher stimuliert ³¹. TGF- β 1 wirkt über parakrine und autokrine Mechanismen regulierend auf Entwicklung, Differenzierung und Funktion von T- und B-Lymphozyten. Unter anderem hemmt es die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen ⁴⁰. TGF- β 1 führt, vermittelt über IL-10, zu einer Erniedrigung des Th1/Th2-Quotienten ⁴¹. In B-Zellen kann TGF- β 1 zudem die Proliferation wie auch die Bildung von Antikörpern modulieren ⁴².

Hohe lokale Konzentrationen von TGF- β 1 wirken chemotaktisch und aktivierend auf proinflammatorische Zellen und Fibroblasten ⁴³. Im Gegensatz dazu inhibieren hohe, systemisch zirkulierende TGF- β 1-Spiegel den lokalen Inflammation

onsprozess. Dies geschieht möglicherweise durch eine Verlagerung der pro-inflammatorischen Zellen aus dem Gewebe in das Gefäßsystem⁴⁴. Im Normalfall wird die erhöhte TGF- β 1 Freisetzung nach Abschluss der Wundheilung durch bisher noch unzureichend geklärte Feedback-Mechanismen gestoppt. Geschieht dies nicht, so kommt es zur Fibrose im betroffenen Gewebe⁴⁴. Dies erfolgt durch Akkumulation von Matrixproteinen mittels gesteigerter Expression von Integrinen, Stimulation von Inhibitoren matrixdegradierender Proteasen sowie durch direkte Inhibierung von Matrix degradierenden Proteasen⁴⁵.

Eine vermehrte TGF- β -Expression könnte somit durch fortschreitende Fibrosierung letztlich zum progressiven Nierenversagen sowohl in der Eigenniere⁴⁶ als auch in der transplantierten Niere führen¹⁰.

1.4.4 Rolle bei der chronischen Transplantatnephropathie

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass die für die chronische Transplantatnephropathie charakteristische Fibrose unter anderem durch eine erhöhte Expression von TGF- β 1 vermittelt wird¹⁰. Die gesteigerte Expression von TGF- β 1 führt zu einer pathologischen Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen mit konsekutiver Fibrose der gesamten Transplantatniere⁴⁷. Die aktive Beteiligung von TGF- β 1 an der renalen Fibrose nach Nierentransplantation wird zudem gestützt durch die Tatsache, dass die Gabe von spezifischen Antikörpern gegen TGF- β 1 die renale Fibrose in der Transplantatniere verhindern kann⁴⁸.

1.5 Endothelin

1.5.1 Überblick

Die Funktion des Endothels wurde lange Zeit hauptsächlich in der Bildung einer stabilen Barriere zwischen Blut und Gefäßwand gesehen. Erst seit den 70er Jahren sind Botenstoffe bekannt⁴⁹, die von Endothelzellen freigesetzt werden

und wichtige Funktionen bei der Regulation des Gefäßtonus, der Proliferation von Endothelzellen und der Thrombozytenfunktion innehaben⁵⁰. Endothelin wird allgemein als das bedeutendste Peptid dieser Gruppe angesehen, da es neben stark vasokonstriktiven Effekten auch eng mit Entstehung und Verlauf zahlreicher Erkrankungen wie der arteriellen und pulmonalen Hypertonie, der Arteriosklerose, der koronaren Herzkrankheit, der pulmonalen Fibrose, der Sklerodermie und der chronischen Niereninsuffizienz verbunden ist⁵¹.

1.5.2 Struktur, Aktivierung und Rezeptoren

Bei der Suche nach dem Endothelium-derived relaxing Factor (EDRF) wurde in kultivierten Endothelzellen der Aorta eine stark vasokonstriktiv wirkende Substanz entdeckt, welche innerhalb weniger Jahre als 21-Aminosäurenpeptid identifiziert werden konnte und den Namen Endothelin erhielt⁵².

Insgesamt wurden drei verschiedene Isoformen entdeckt, welche sich untereinander nur in der Sequenz weniger Aminosäuren unterscheiden. Der Aufbau des Peptids ist charakterisiert durch eine Kette aus 21 Aminosäuren, welche durch zwei Disulfidbrücken, die jeweils Cysteinbausteine verbinden, gefaltet ist⁵³.

Die Translation der kodierenden mRNA ergibt ein Vorläufer-Peptid bestehend aus 203 Aminosäuren, welches als Präpro-Endothelin-1 bezeichnet wird. Nach Spaltung durch Endopeptidasen entsteht Pro-Endothelin 1, welches auch big Endothelin-1 (bigET-1) genannt wird. Zur biologischen Aktivierung wird bigET-1 aus der Zelle ausgeschleust und in das aktive Endothelin-1 (ET-1) umgewandelt. Dies geschieht durch Spaltung des aus 38 Aminosäuren bestehenden bigET-1 mittels Endothelin converting enzyme (ECE) in das aus 21 Aminosäuren zusammengesetzte aktive Endothelin-1 und das C-terminale Fragment. Das physiologisch aktive Endothelin wird daher auch als Endothelin 1-21 bezeichnet. Das C-terminale Fragment umfasst die Aminosäuren 22-38⁵⁴. Endothelin wird nicht in sekretorischen Granula gespeichert, sondern bei Bedarf neu synthetisiert. Produktion und Freisetzung unterliegen einer Regulation durch stimulierende Faktoren wie z.B. Hypoxie, Scherstress, Angiotensin II,

Thrombin, Zytokine und Katecholamine sowie inhibierende Faktoren wie z.B. NO, Prostazyklin, Atrial Natriuretisches Peptid (ANP) und Östrogene^{55, 56}.

1.5.3 Funktion

ET-1 wird hauptsächlich von Endothelzellen gebildet und auf der abluminalen Seite in Richtung glatter Muskelzellen hin freigesetzt, um die glatten Muskelzellen zur Kontraktion anzuregen. Außerdem wird ET-1 unter anderem auch von Leukozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Mesangiumzellen gebildet⁵⁷. Lokal (parakrin) werden ET-1-Konzentrationen erreicht, welche die messbaren Plasmaspiegel deutlich übersteigen. Der im peripheren Blut bei Gesunden messbare ET-1-Spiegel beträgt ca. 5 pmol/l (12 pg/ml), während die notwendige Schwellen-Konzentration zur ET-1-induzierten Vasokonstriktion im nanomolaren Konzentrationsbereich liegt⁵⁷. Die Plasmakonzentration von ET-1 ist somit deutlich niedriger als die zur Auslösung biologischer Effekte notwendige Gewebekonzentration⁵⁴. Verschiedene Krankheitszustände, wie beispielsweise Arteriosklerose und pulmonale Hypertonie sind mit erhöhten ET-1-Plasmaspiegeln assoziiert⁵⁸. Die Wirkung von Endothelin kann über zwei verschiedene Endothelinrezeptoren vermittelt werden, den ET_A- und den ET_B-Rezeptor. Die Affinität des ET_A-Rezeptors für ET-1 und ET-2 ist ca. 100-fach höher als für ET-3, während der ET_B-Rezeptor alle drei ET-Isopeptide mit ähnlicher Affinität bindet. Die Bindung von ET-1 an den ET_A-Rezeptor induziert vor allem Vasokonstriktion und Zellproliferation⁵⁹. Demgegenüber bewirkt die Aktivierung des ET_B-Rezeptors die Freisetzung von NO und Prostazyklin, die Hemmung der Apoptose und die Hemmung der ECE-Expression in Endothelzellen⁶⁰.

Auf auto- und parakrine Weise übernimmt das Endothelin-System wichtige physiologische und pathophysiologische Funktionen bei der Embryonal- und Neonatal-Entwicklung, im Gefäßsystem (Vasokonstriktion, Atherosklerose), im Herz (Inotropie, Chronotropie, Remodeling), in der Lunge (Tonus der Lungengefäße und Luftwege), in der Niere (renaler Blutfluss, Salz- und Wasser-Haushalt, Säure-Basen-Haushalt) und im Gehirn (Modulation kardialer und respiratorischer Zentren, Hormonfreisetzung)⁵⁸. Teilweise existieren auch

gegensätzliche Mechanismen, so verursacht beispielsweise ET-1 über den ET_A-Rezeptor eine Vasokonstriktion und über den ET_B-Rezeptor eine Vasodilatation⁵⁰. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von ET-1 unabhängig vom arteriellen Blutdruck eine interstitielle Fibrose und eine Glomerulosklerose mit zunehmendem Verlust der Nierenfunktion verursacht⁶¹. Die Gabe von ET_A-Rezeptor-Antagonisten kann dagegen das Fortschreiten einer chronischen Niereninsuffizienz aufhalten⁶². Auch bei der chronischen Transplantatnephropathie scheint das Endothelin-System pathogenetisch relevant zu sein. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass die Gabe von ET_A-Antagonisten die Entwicklung einer chronischen Transplantatnephropathie verhindert^{63, 64}.

1.6 Immunsuppressiva

1.6.1 Calcium-Calcineurin-Signalweg

Die Bindung von Antigen an den spezifischen T-Zell-Rezeptor in Verbindung mit den notwendigen Kostimuli (2. Signal) löst bei der T-Zelle eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Hierbei kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Durch Anlagerung von Ca²⁺ an das Calcium-bindende Protein Calmodulin wird dessen Konformation verändert und in die aktive Form überführt⁶⁵. Der Calcium-Calmodulin-Komplex aktiviert in einem nächsten Schritt die Phosphatase Calcineurin⁶⁶. Calcineurin dephosphoryliert den "Nuclear Factor of Activated T-cells" (NFAT) und versetzt ihn dadurch in die Lage, in den Zellkern einzudringen und die Transkription spezifischer Gene zu aktivieren⁶⁷, welche wichtige Zytokine wie z.B. Interleukin-2 (IL-2) kodieren. Im Nukleus schützt Calcineurin den dephosphorylierten NFAT vor Kinasen, welche NFAT wieder phosphorylisieren würden. Die Inhibition von Calcineurin führt daher dazu, dass NFAT phosphoryliert bleibt und demzufolge nicht in den Zellkern eindringen und die Produktion essentieller Zytokine auslösen kann. Die Calcineurin-Aktivierung ist somit ein limitierender Schritt in der T-Zell-Aktivierung.

1.6.2 Calcineurin-Inhibitoren (CNI)

Cyclosporin A und Tacrolimus sind die beiden Prototypen dieser Gruppe von Immunsuppressiva. Obwohl beide über eine Inhibition von Calcineurin wirken, unterscheiden sie sich in Bezug auf die Immunosuppressiva, mit denen sie einen Komplex bilden, der schließlich Calcineurin inhibiert. Cyclosporin A bindet an Cyclophilin, während Tacrolimus an das FK-Binding Protein (FKBP) bindet. Beide CNI-Immuno-philin-Komplexe verhindern die Aktivierung der Phosphatase Calcineurin.

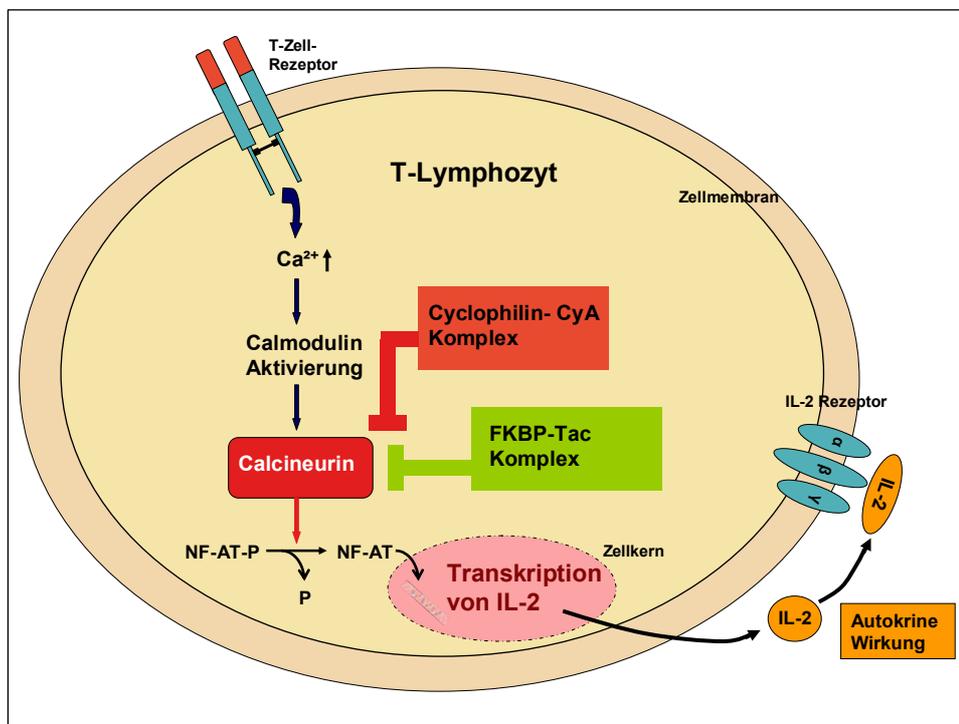


Abbildung 6: Wirkmechanismus der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus. Cyclosporin A (CyA) bindet an Cyclophilin während Tacrolimus (Tac) einen Komplex mit dem FK-Binding Protein (FKBP) eingeht. Beide Komplexe inhibieren unabhängig voneinander die Phosphatase Calcineurin. Dies führt über eine verminderte Transkription von Interleukin 2 (IL-2) zur Hemmung der T-Zell-Aktivierung.

1.6.3 Cyclosporin A

Cyclosporin A wurde als zyklisches Polypeptid aus dem Pilz *Tolypocladium Inflatum* Gams aus norwegischen Bodenproben isoliert ⁶⁸. Seit den 70er Jahren sind die immunsuppressiven Eigenschaften von Cyclosporin A bekannt. Durch die Einführung von Cyclosporin A in den 80er Jahren war erstmalig eine potente, relativ spezifische, nicht zytotoxische Suppression der T-Zell-Aktivität möglich. Von der Markteinführung 1983/84 bis heute bildet Cyclosporin A einen der Eckpfeiler der modernen Transplantationsmedizin. Das 5-Jahres-Transplantat-Überleben nach Nierentransplantation konnte dadurch um mehr als 10% verbessert werden ⁶⁹. Problematisch war die Tatsache, dass Cyclosporin A nicht wasserlöslich ist. Die ursprüngliche Darreichungsform (Sandimmun[®]) war aufgrund der physikochemischen Struktur von Cyclosporin A schlecht resorbierbar. Die Resorption und in Folge die Blutkonzentration waren außerdem abhängig von Gallefluss und Darm-Motilität. Aus diesen Gründen kam es nach oraler Verabreichung zu beträchtlichen Unterschieden in der Bioverfügbarkeit. Mit Hilfe der Mikroemulsionstechnologie wurde daher eine verbesserte Darreichungsform entwickelt (Sandimmun Neoral[®]). Die neue Galenik führt zu einer schnellen Auflösung im Magen-Darm-Trakt mit nur geringer Abhängigkeit von Gallefluss und Darm-Motilität. Die Metabolisierung von Cyclosporin A erfolgt hauptsächlich hepatisch. Hier erfolgt der Abbau über das Cytochrom P450-System. Dadurch ergibt sich eine Reihe von klinisch relevanten Interaktionen mit anderen Wirkstoffen, die ebenfalls über das Cytochrom P450-System metabolisiert werden. Die Eliminierung erfolgt zu 95 % biliär und zu 5 % renal. Die Halbwertszeit von Cyclosporin A beträgt im Mittel 8,5 Stunden und kann bei Leberfunktionsstörungen deutlich verlängert sein. Insgesamt sind ca. 25 Cyclosporin-Metabolite bekannt, wobei einige davon immunsuppressive Eigenschaften aufweisen, mit jedoch deutlich geringerer Potenz als die Muttersubstanz. Klinisch relevante Nebenwirkungen von Cyclosporin A sind unter anderem arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Gingivahyperplasie, Diabetes mellitus, Hypertrichose, Neurotoxizität, Hepatotoxizität, Hyperurikämie, Hyperkaliämie, Hypomagnesiämie sowie akute und chronische Nephrotoxizität ^{20, 70}.

1.6.4 Monitoring von Cyclosporin A

Die Messung der CyA-Spiegel erfolgt im Vollblut. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Transplantation, vom immunologischen Risiko, von der begleitenden immunsuppressiven Therapie und von möglichen Nebenwirkungen werden unterschiedliche Spiegel angestrebt. Der Grad der Calcineurinhemmung ist eng mit der Höhe des CyA-Spiegels verknüpft ⁷¹. Bei wiederholter Gabe bleibt der biologische Effekt voll erhalten, es kommt nicht zur Adaption ⁷¹. Im klinischen Alltag basiert die CyA-Dosierung zumeist auf der Messung des Talspiegels (trough level). In Bezug auf die Höhe der angestrebten Talspiegel ist anzumerken, dass hier eine erhebliche Variabilität zwischen den verschiedenen Transplantationszentren besteht. Die "Area Under the Curve" (AUC) korreliert besser mit der Medikamentenexposition und mit relevanten klinischen Ereignissen als der Talspiegel. Der C2-Spiegel (zwei Stunden nach Einnahme) korreliert wiederum besser mit der AUC als der C0-Spiegel ⁷². Die Bestimmung von C2-Spiegeln hat sich jedoch in der klinischen Praxis nicht uneingeschränkt durchgesetzt, da die Entnahme genau $2 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ nach Einnahme erfolgen muss. Darüber hinaus resorbieren 10 - 30 % der Patienten – insbesondere in der Frühphase nach Transplantation – CyA in zu geringem Umfang („low absorbers“) oder zu langsam („delayed absorbers“). Diese Patienten können mit der alleinigen Bestimmung von C2-Spiegeln nicht identifiziert werden ^{73, 74}.

1.6.5 Tacrolimus / FK 506

Tacrolimus / FK 506 ist ein Makrolid, welches 1984 aus dem Pilz *Streptomyces Tsukabaensis* isoliert wurde und seit 1994 zugelassen ist ⁷⁵. Es besitzt im Vergleich zu CyA auf molarer Basis eine höhere immunsuppressive Potenz ⁷⁶. Seit der Einführung besteht eine lang anhaltende Diskussion über die Vor- bzw. Nachteile gegenüber CyA. In klinischen Studien wurde unter Tacrolimus meist eine, im Vergleich zu CyA, geringere Inzidenz von Rejektionen beobachtet ⁷⁷. Allerdings konnte bisher keine Verbesserung des Transplantatüberlebens gegenüber einer CyA-Behandlung nachgewiesen werden. Lediglich bei hohem

immunologischen Risiko scheint eine initiale Therapie mit Tacrolimus auch in dieser Hinsicht von Vorteil zu sein ⁷⁸. Eine aktuelle Übersichtsarbeit der Cochrane Collaboration kommt zu dem Ergebnis, dass Tacrolimus in Bezug auf das alleinige Organüberleben (Tod mit funktionierendem Organ zensiert) und das Auftreten akuter Rejektionen gegenüber CyA überlegen ist. Keine Unterschiede zeigten sich jedoch beim Transplantatüberleben (Patienten mit funktionierendem Transplantat) ⁷⁹. Allerdings haben Patienten, die Tacrolimus erhalten, im Vergleich zu CyA-behandelten Patienten ein höheres Risiko einen Diabetes mellitus, neurologische oder gastrointestinale Nebenwirkungen zu entwickeln. Tacrolimus wird ebenso wie CyA über Enzyme des Cytochrom-P450-Systems metabolisiert. Daraus resultiert eine - im Vergleich zu CyA - Vielzahl von nahezu identischen Interaktionen mit anderen Wirkstoffen. Auch das Nebenwirkungsprofil beider Medikamente zeigt zahlreiche Überschneidungen. Zu beobachten sind unter anderem arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Neurotoxizität, Hepatotoxizität, Haarausfall, Hyperkaliämie, Hypomagnesiämie sowie akute und chronische Nephrotoxizität ⁸⁰.

1.6.6 Monitoring von Tacrolimus / FK 506

Die Bestimmung der Tacrolimus-Spiegel erfolgt ebenfalls im Vollblut. Bei Tacrolimus besteht eine gute Korrelation zwischen Talspiegel, Medikamentenexposition und Wirkung ⁸¹. Daher werden im klinischen Alltag grundsätzlich Talspiegel bestimmt. Allgemein wird für die Tacrolimustherapie in der Frühphase nach Nierentransplantation ein Talspiegel von 10-15 ng/ml empfohlen. Nach ca. 1-3 Monaten kann dann eine Dosisreduktion auf Zielspiegel von 5-8 ng/ml erfolgen.

1.6.7 Nephrotoxizität von Calcineurin-Inhibitoren

Durch die Einführung von CyA und Tacrolimus konnte die Inzidenz akuter Rejektionen reduziert und dadurch das durchschnittliche Transplantatüberleben

signifikant verlängert werden ⁸¹. Im Laufe der Jahre hat sich jedoch herauskristallisiert, dass beide Substanzen nephrotoxische Nebenwirkungen haben, welche sich langfristig ungünstig auf das Transplantatüberleben auswirken. Aufgrund der späteren Einführung von Tacrolimus bestand zunächst die Hoffnung, dass diese nephrotoxischen Nebenwirkungen auf CyA beschränkt sind. Inzwischen ist jedoch klar geworden, dass Tacrolimus strukturell nahezu identische Veränderungen in der Niere hervorruft wie CyA ²⁰. Der Begriff Cyclosporin-Nephrotoxizität wurde daher in den letzten Jahren zugunsten des Begriffs Calcineurin-Inhibitor- (CNI-) Nephrotoxizität verlassen.

Grundsätzlich ist zwischen der akuten und der chronischen CNI-Nephrotoxizität zu unterscheiden. Bei der akuten, funktionellen CNI-Nephrotoxizität kommt es zu einer dosisabhängigen Verringerung der glomerulären Perfusion und der GFR bedingt durch eine Vasokonstriktion am Vas afferens. Histologisch ist bei Nierenbiopsien in der Frühphase nach Transplantation oftmals eine reversible, isometrische Tubulusepithelvacuolisierung zu diagnostizieren. Demgegenüber finden sich bei der chronischen CNI-Nephrotoxizität schwerwiegende, irreversible, strukturelle Veränderungen in Form einer streifenförmigen oder diffusen interstitiellen Fibrose mit Tubulusatrophie, Arterioloehyalinose, Intimafibrose und Glomerulosklerose ²³. Die Diagnose einer chronischen CNI-Nephrotoxizität wird anhand der histologischen Untersuchung gestellt. Pathogenetisch wird für die chronische CNI-Nephrotoxizität unter anderem ein erhöhter TGF- β Spiegel verantwortlich gemacht. Khanna et al. zeigten in vivo, dass die Gabe von TGF- β 1 eine CyA-ähnliche Nephrotoxizität verursachen kann während die Gabe von anti-TGF- β 1-Antikörpern die Entwicklung einer chronischen CyA-Nephrotoxizität verhindern kann ⁸². Pankewycz et al. konnten des weiteren eine erhöhte TGF- β Protein-Expression in Nierenbiopsien von Patienten mit chronischer Cyclosporin-Nephrotoxizität nachweisen ⁸³. Erhöhte TGF- β -Spiegel resultieren in einer vermehrten Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen (ECM) in der gesamten Niere mit zunehmendem Verlust der Transplantatnierenfunktion ⁴⁷. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass Prostaglandin E (PGE) ⁸⁴ ebenso wie der neu entwickelte Wirkstoff Pirfenidone ⁸⁵ durch TGF- β 1-antagonistische Effekte die Entwicklung einer chronischen CNI-Nephrotoxizität möglicherweise verhindern können.

1.6.8 Mycophenolatmofetil (MMF)

Der pharmakologisch aktive Wirkstoff Mycophenolat (MPA) entsteht durch Hydrolyse von MMF (Prodrug). Durch eine reversible, nicht kompetitive Hemmung des Enzyms Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), dem limitierenden Enzym der de novo-GTP-Biosynthese, blockiert MPA die de novo-Synthese des Purins Guanosin. Dies führt zu einer selektiven Depletion des Guanin-Nukleotid-Pools und damit zu einer Inhibition der RNA- und DNA-Synthese im Lymphozyten, da proliferierenden Lymphozyten der alternative "Salvage Pathway" zur Purin-Synthese nicht zur Verfügung steht⁸⁶. Zusätzlich inhibiert MPA auch die Antikörperbildung, die Produktion bestimmter Wachstumsfaktoren und Zytokine wie PDGF, TGF- β 1, IL-2, TNF- α und IFN- γ sowie die Aktivität von G-Proteinen, die in die Signal-Transduktion und Glykosylierung von Adhäsions-Molekülen involviert sind^{87, 88}. MMF ist seit 1996 zur immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation zugelassen und hat Azathioprin inzwischen fast vollständig ersetzt. In drei großen prospektiven Studien wurde gezeigt, dass MMF die Inzidenz von Rejektionsepisoden nach Nierentransplantation um ca. 50% reduziert⁸⁹⁻⁹¹. Aktuelle Studien zeigen, dass der Einsatz von MMF bei Patienten mit chronischer CyA-Nephrotoxizität^{92, 93} oder chronischer Transplantatdysfunktion⁹⁴⁻⁹⁶ einen günstigen Effekt haben kann. Ähnliche Ergebnisse konnten auch im Tiermodell beobachtet werden⁹⁷⁻⁹⁹. Die häufigsten Nebenwirkungen einer MMF-Therapie sind Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Leukozytopenie, Anämie und Thrombozytopenie.

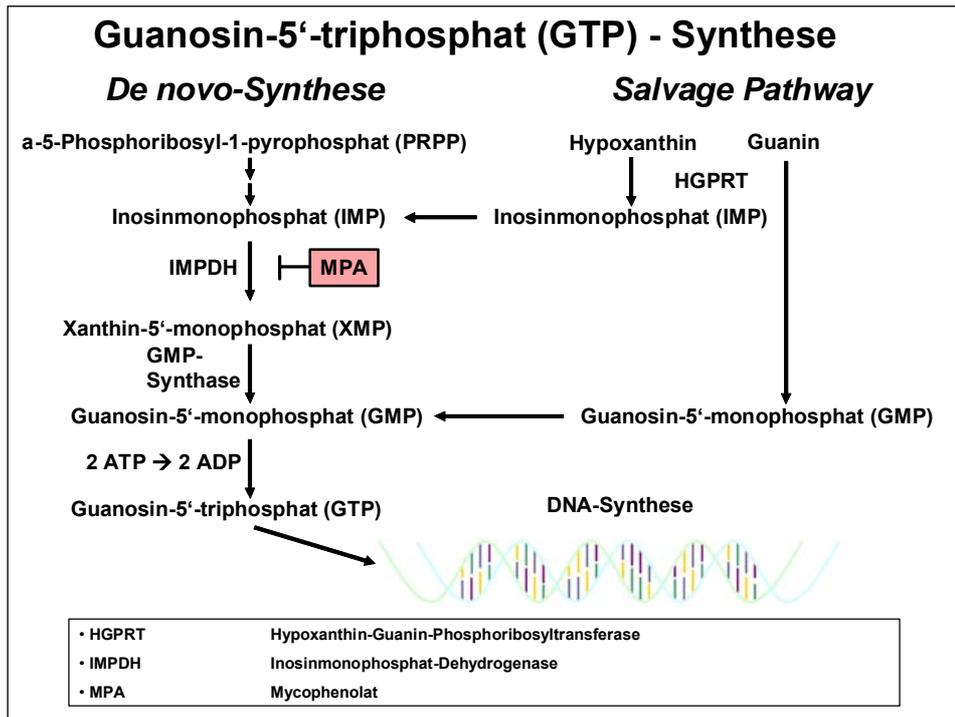


Abbildung 7: Biosynthese des Purins Guanosin durch die de-novo-Synthese und den alternativen Wiederverwertungsstoffwechsel „Salvage Pathway“. Purine sind für die RNA- und DNA-Synthese von essentieller Bedeutung. Durch Mycophenolat (MPA) wird das Enzym Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) gehemmt. Dieses ist ein Schlüsselenzym im Aufbau von Guanosinmonophosphat (GMP) und Guanosintriphosphat (GTP) aus Inosinmonophosphat (IMP). Aktivierte T- und B-Lymphozyten sind auf die de novo-GTP-Synthese angewiesen, welche effektiv durch MPA gehemmt wird. Hingegen profitieren ruhende Lymphozyten wie auch nichtlymphozytäre, rasch proliferierende Zellen vom Salvage Pathway.

1.6.9 Monitoring von MMF

Die Dosierung von MMF erfolgt in Abhängigkeit vom immunologischen Risiko, von der immunsuppressiven Komedikation und von den objektivierbaren Nebenwirkungen nach festen Schemen. Meist wird eine Dosierung von 2 x 1 g oder 2 x 500 mg gewählt. MPA-Blutspiegelmessungen ebenso wie die Bestimmung der IMPDH-Aktivität haben sich in der klinischen Routine bislang nicht durchgesetzt.

1.6.10 Rapamycin / Sirolimus

Rapamycin / Sirolimus wurde aus dem Pilz *Streptomyces Hygroscopicus* isoliert und nach dem Fundort des Pilzes, den Osterinseln, auf polynesisch "Rapa Nui", benannt ⁷⁵. Rapamycin ist wie Tacrolimus ein Makrolid und bindet intrazellulär, ebenfalls wie Tacrolimus, an das Immunophilin FK-Binding Protein (FKBP) ¹⁰⁰. Der Komplex bindet im Zytoplasma der Zelle an das Protein mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Der Rapamycin-FKBP-mTOR-Komplex bewirkt eine Blockade der IL-2 Rezeptor vermittelten Signaltransduktion. Es kommt zur Blockade der p70 S6-Kinase und der nachfolgenden Proteinsynthese ¹⁰¹. Infolgedessen werden die T-Lymphozyten in der späten G1-Phase des Zellzyklus arretiert ^{102, 103}. Rapamycin wird ebenso wie Cyclosporin A und Tacrolimus über das Cytochrom-P450-System metabolisiert. Die Halbwertszeit von Rapamycin bei nierentransplantierten Patienten ist mit ca. 60 Stunden relativ lang. Rapamycin ist seit 2001 als Medikament für die Nierentransplantation zugelassen.

Die immunologische Potenz von Rapamycin ist vergleichbar mit CyA. Zwei prospektive Studien zeigten keine Unterschiede in der Inzidenz von akuten Rejektionen und im Transplantatüberleben zwischen Patienten, die Sirolimus oder CyA in Kombination mit Steroiden und Azathioprin ¹⁰⁴ bzw. MMF ¹⁰⁵ erhielten. Bei Patienten, die mit CyA und Steroiden behandelt werden, senkte die zusätzliche Gabe von Sirolimus die Inzidenz akuter Rejektionen um ca. 50% ¹⁰⁶. Das Transplantatüberleben wurde dadurch allerdings nicht verbessert. Im Vergleich zu Azathioprin reduzierte Sirolimus die Inzidenz akuter Rejektionen um ca. 50% ¹⁰⁷. Auch hier war jedoch kein zusätzlicher Effekt auf das Transplantatüberleben erkennbar.

Im Nebenwirkungsspektrum existieren beträchtliche Unterschiede zwischen CyA und Rapamycin. Insbesondere geht man davon aus, dass Rapamycin nicht nephrotoxisch ist. Daher können Patienten mit gesicherter CNI-Nephrotoxizität erfolgreich von CyA oder Tacrolimus auf Rapamycin umgestellt werden ^{108, 109}. Als relevante Nebenwirkungen sind unter anderem die Myelotoxizität mit Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie, die Hyperlipidämie, die nicht infektiöse interstitielle Pneumonitis sowie postoperative Lymphozelen und Wundheilungsstörungen zu erwähnen. Aufgrund des gehäuften Auftretens von

Pneumocystis carinii-Pneumonien (PcP) wird zudem eine einjährige Prophylaxe mit TMP-SMZ empfohlen.

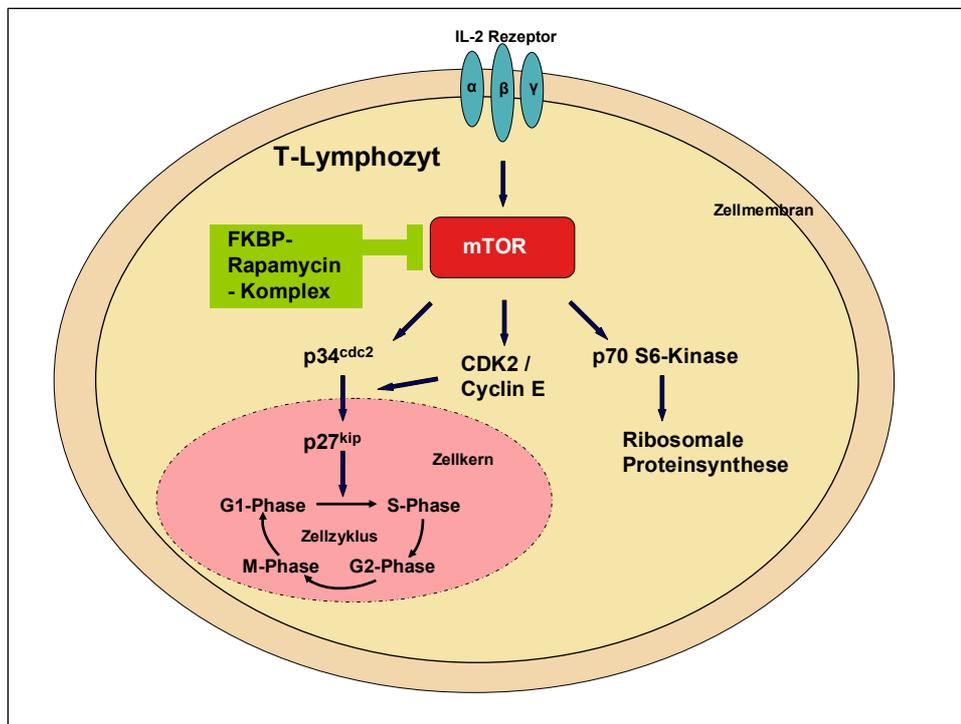


Abbildung 8: Wirkmechanismus von Rapamycin. Rapamycin geht mit dem FK-Binding Protein (FKBP) einen Komplex ein. Der FKBP-Rapamycin-Komplex bindet an das mammalian Target of Rapamycin (mTOR). Dies führt durch Hemmung der weiteren Signalkaskade zur Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase.

1.6.11 Monitoring von Rapamycin / Sirolimus

Die Messung von Rapamycin erfolgt als Talspiegelbestimmung. Aufgrund einer guten Korrelation von Talspiegel und AUC wird der C0-Wert allgemein für das Monitoring von Rapamycin empfohlen¹¹⁰. Zur individuellen Anpassung der Dosis sollte die wöchentliche Bestimmung von Talspiegeln erfolgen (Ziel: 5-15 ng/ml). Die lange Halbwertszeit (ca. 60 Stunden) erlaubt es, die gesamte Tagesdosis in einer Portion einzunehmen. Aufgrund der Tatsache, dass Rapamycin ebenso wie CyA hauptsächlich über das CYP3A4-Enzymsystem metabolisiert wird, führt die zeitgleiche Einnahme von Rapamycin und CyA zu einer Erhöhung der Rapamycin-Talspiegel und der Medikamentenexposition¹¹¹. Die Einnahme von Rapamycin muss daher vier Stunden zeitversetzt im Vergleich zur CyA-Einnahme (CyA: 8.00 Uhr, Rapamycin: 12.00 Uhr) erfolgen.

1.7 Herleitung der Aufgabenstellung

Die chronische Transplantatnephropathie zählt zu den größten Herausforderungen in der aktuellen Transplantationsmedizin. Calcineurin-Inhibitoren haben sich in der Prophylaxe akuter Rejektionen nach Nierentransplantation als sehr wirkungsvoll erwiesen und dadurch das Transplantatüberleben signifikant verbessert. Bis heute ist diese Substanzklasse in der immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation daher unverzichtbar. Der immunsuppressive Effekt der Calcineurin-Inhibitoren wird hauptsächlich durch die Hemmung der Produktion von Interleukin-2 vermittelt. Daneben stimulieren Calcineurin-Inhibitoren aber auch die Produktion von TGF- β 1. TGF- β 1 hat einerseits potente immunsuppressive Effekte, andererseits aber auch potente profibrotische Effekte. Man nimmt an, dass ein Teil der immunsuppressiven Effekte von Calcineurin-Inhibitoren durch die vermehrte Expression von TGF- β 1 vermittelt wird. Es steht heute fest, dass TGF- β 1 maßgeblich an der Pathogenese der chronischen Transplantatnephropathie beteiligt ist. Neuere Daten zeigen, dass auch ET-1 eine wichtige Rolle spielt. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Führen Unterschiede in der immunsuppressiven Therapie zu unterschiedlichen TGF- β 1-/ET-1-Konzentrationen im Plasma?
2. Führen Unterschiede in der immunsuppressiven Therapie zu unterschiedlichen TGF- β 1-Konzentrationen im Überstand kultivierter T-Zellen?
3. Korreliert die Höhe der gemessenen Medikamentenspiegel mit der Höhe der TGF- β 1-/ET-1-Plasma-Konzentrationen?
4. Korreliert die Höhe der gemessenen Medikamentenspiegel mit der Höhe der TGF- β 1-Konzentration im Überstand kultivierter T-Zellen?
5. Korrelieren die Dosierungen/Konzentrationen der immunsuppressiven Medikation oder die gemessenen TGF- β 1-Konzentrationen mit der messbaren Lymphozytenproliferation?
6. Welchen Einfluss haben weitere Variablen auf die gemessenen Parameter?
7. Korrelieren die gemessenen TGF- β 1-/ET-1-Plasmakonzentrationen

mit der Transplantatfunktion oder dem Transplantatüberleben?

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Sämtliche Untersuchungen wurden zwischen 2001 und 2004 durchgeführt. Insgesamt wurden 69 nierentransplantierte Patienten mit stabiler Transplantatfunktion innerhalb der vorausgehenden 6 Monate vor Beginn der Studie nach schriftlicher Aufklärung eingeschlossen. Die Studie wurde entsprechend den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. In Abhängigkeit von der jeweiligen immunsuppressiven Erhaltungstherapie wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt:

- A (n = 35) Cyclosporin A (Sandimmun optoral[®]) + MMF (CellCept[®])
- B (n = 28) Tacrolimus (Prograf[®]) + MMF (CellCept[®])
- C (n = 6) Cyclosporin A (Sandimmun optoral[®]) + Rapamycin (Rapamune[®])

Die Patienten in den untersuchten drei Gruppen waren während des Untersuchungszeitraums frei von einer immunsuppressiven Therapie mit Steroiden.

Die Blutproben wurden im Rahmen ambulanter Besuche in der Transplantationssprechstunde der Charité, Campus Mitte abgenommen. Pro Patient erfolgten durchschnittlich drei Blutentnahmen zu unterschiedlichen Terminen. Aus den drei Blutentnahmen wurden die Mittelwerte berechnet und für die weitere statistische Auswertung herangezogen. Für die untersuchten Parameter fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Untersuchungstagen.

2.2 Materialien

2.2.1 Fertigprodukte

- ELISA-Kit Duo Set Human TGF- β 1 (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland, Kat.-Nr. DY 240)

- ELISA-Kit für Endothelin 1-21 (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co. KG, Wien, Österreich, Kat.-Nr. BI-20052)
- BD Vacutainer CTAD 4,5 ml (BD Vacutainer Systems, Franklin Lakes, USA, Kat.-Nr. 367599)
- S-Monovette 2,7 ml, Kalium-EDTA (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland, Kat.-Nr. 05.1167.001)
- S-Monovette 5 ml, Citrat 3,13% (Sarstedt AG & Co., Kat.-Nr. 05.1071.001)

2.2.2 Lösungen und Puffer

- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland, Kat.-Nr. H15-002)
- RPMI Dulbecco's MEM (Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Kat.-Nr. F0415)
- Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland, Kat.-Nr. 17-1440-02)
- 1,2N NaOH / 0,5M HEPES: 140 ml deionisiertes H₂O / 30 ml 10N NaOH / 59,5 g HEPES mit deionisiertem H₂O auf 250 ml bringen
- 2,5N Eisessig / 10M Harnstoff: 100 ml deionisiertes H₂O / 150,2 g Harnstoff / 35,9 ml Eisessig mit deionisiertem H₂O auf 250 ml bringen
- 2,7N NaOH / 1M HEPES: 140 ml deionisiertes H₂O / 67,5 ml 10N NaOH / 59,5 g HEPES mit deionisiertem H₂O auf 250 ml bringen

2.2.3 Chemikalien

- Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, Kat.-Nr. A 3059)
- Essigsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Kat.-Nr. 109951)
- Farbstoff T-0440 für ELISA-Kit 3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin (TMB) Liquid Substrate System für ELISA (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.

032K1264)

- Harnstoff (Merck, Kat.-Nr. 108486)
- HEPES 2-[4- (2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure (Merck, Kat.-Nr. 110110)
- MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl blue (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. M 5655)
- Natriumbikarbonat NaHCO_3 (Sigma-Aldrich)
- Natronlauge NaOH (Merck, Kat.-Nr. 109959)
- Salzsäure HCl (Merck, Kat.-Nr. 109911)
- Schwefelsäure H_2SO_4 (Merck, Kat.-Nr. 109912)
- SDS Sodium Dodecyl Sulfat (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. L 4509)
- Tween 20 Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Merck, Kat.-Nr. 817072)

2.2.4 Antikörper

- anti-CD3 (OKT3, eBioscience, San Diego, CA, USA, Kat.-Nr. 16-0037)

2.2.5 Glas- und Plastikwaren

- 6 Well-Zellkulturplatten Falcon (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA, Kat.-Nr. 3046)
- 96 Well-Zellkulturplatten Falcon (Becton Dickinson Labware, Kat.-Nr. 3072)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml (Nunc, Karlsruhe, Deutschland, Kat.-Nr. 366052A)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (Nunc, Kat.-Nr. 373660A)
- Immunoplate U 96 Maxisorb ELISA-Mikrotiterplatten (Nunc, Kat.-Nr. 051531)
- Pasteurpipetten (Brand, Wertheim, Deutschland)

- Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml (Becton Dickinson Labware, Kat.-Nr. 7507, 7543, 7551, 7525)
- Combitip 2,5ml, 5ml (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland, Kat.-Nr. 0030069.242, 0030069.455)

2.2.6 Geräte

- Brutschrank Cell House 200 (Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark)
- ELISA-Gerät MRX-Microplate Reader (Dynatech Medical Products, Guernsey, Channel Islands, UK)
- Zellzählgerät Casy 1 Modell DT (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland)
- Tischzentrifuge 5451C (Eppendorf)
- Vortexmixer G560-E (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
- Zentrifuge, Megafuge 2.0R (Heraeus, Hanau, Deutschland)

2.3 Methoden

2.3.1 Gewinnung der Proben

Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor Einnahme der immunsuppressiven Medikation (C0) sowie bei CyA-behandelten Patienten zusätzlich 2 Stunden \pm 10 Minuten nach Einnahme (C2). Patienten und medizinisches Personal wurden auf die Notwendigkeit der Einhaltung des vorgeschriebenen Zeitabstandes eindringlich hingewiesen. Die Zeitpunkte der Medikamenteneinnahme und der Blutentnahmen wurden dokumentiert. Proben, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden verworfen. Bei der Blutentnahme zum Zeitpunkt C0 wurden insgesamt 2 x 5 ml Citratblut, 1 x 2,7 ml EDTA-Blut und 1 x 4,5 ml mittels BD Vacutainer® in CTAD-Röhrchen abgenommen. Zum Zeitpunkt C2 gewannen wir 1 x 2,7 ml EDTA-Blut. Die Lagerung der Citratblutproben bis zur weiteren Verarbeitung

(Messung der Lymphozytenproliferation) erfolgte bei +4 °C für maximal 2 Stunden. CTAD-Blut (enthält neben Citrat auch die Thrombozyteninhibitoren Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol) wurde unverzüglich nach Entnahme bei 2800 U/min (1647 x g) für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abgenommen und in drei identische 1,5 ml Tubes aufgenommen, welche unverzüglich bis zur Messung bei -20 °C eingelagert wurden. Aus dem EDTA-Blut erfolgte die Messung der Tacrolimus- und CyA-Spiegel durch das Institut für Klinische Pharmakologie.

2.3.2 Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

In zwei parallelen Ansätzen wurden je 2 ml Citratblut zusammen mit je 3 ml PBS-Lösung in ein 5 ml Falconröhrchen gegeben und mit Hilfe einer Pipette gut gemischt. Dann wurden 3 ml Ficoll-Lösung in ein 10 ml Falconröhrchen gegeben und mit 5 ml Blut-/PBS-Lösung vorsichtig überschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei ausgeschalteter Bremse mit 2000 U/min (840 x g) für 20 min bei 15 – 20 °C. Dadurch entstand eine Schichtung der Probe in folgender Reihenfolge (von oben nach unten): Plasma – Lymphozytenpellet – Ficoll-Paque – Sediment (bestehend aus Granulozyten und Erythrozyten). Mit einer Pasteur-Pipette wurde das Lymphozytenpellet nun vorsichtig abgenommen und in ein 10 ml Falconröhrchen gegeben. Nach Auffüllen des verbleibenden Volumens mit PBS wurde resuspendiert und für 10 min mit 1800 U/min (681 x g) bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und 2,5 ml RPMI-Medium zum Lymphozytenpellet hinzugegeben. Anschließend wurde erneut resuspendiert und die beiden parallel verarbeiteten Ansätze des jeweiligen Probanden zusammengeführt. Nach Bestimmung der Lymphozytenkonzentration mittels Zellzählgerät wurde die Zellzahl mit RPMI-Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in zwei Ansätze geteilt. Zum einen Ansatz wurde dann ein monoklonaler Antikörper gegen CD3 (10 ng/ml) gegeben, der andere Ansatz blieb unbehandelt.

2.3.3 MTT-Assay zur Messung der Lymphozytenproliferation

2.3.3.1 Prinzip

1983 entwickelte Mosmann einen quantitativen, colorimetrischen Assay zur Messung der Zellproliferation ¹¹². Dieser Assay basiert auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT durch die mitochondriale Dehydrogenase lebender Zellen. Die Menge der resultierenden blauen Formazanprodukte ist proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Zellkultur.

2.3.3.2 Durchführung

Die beiden Ansätze (\pm anti-CD3) der mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigten und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellten Lymphozyten (siehe 2.3.2) wurden nun auf eine 96-Well-Zellkulturplatte aufgebracht (100 μ l / Well). Im Anschluss wurden die Proben bei 37 °C und 5% CO₂-Spannung für 72 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation erfolgte die Messung der Lymphozytenproliferation. Hierfür wurden je 10 μ l MTT-Lösung pro Well zugegeben und die Zellen anschließend für ca. 4 Stunden bei 37 °C und 5%iger CO₂ Spannung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 100 μ l 10%igem SDS in 0,01 M HCl. Danach wurde die Platte über Nacht bei 37 °C und 5%iger CO₂-Spannung inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Absorptionsmessung im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570nm.

2.3.4 Humaner TGF- β 1 ELISA

2.3.4.1 Bedeutung der Blutentnahmetechnik für die Messung der TGF- β -Konzentration im Blut

Die α -Granula von Thrombozyten enthalten große Mengen von TGF- β ¹¹³. Durch die Thrombozyten-Degranulation im Rahmen der Blutgerinnung kann es daher zu einem artifiziellen Anstieg der TGF- β -Konzentration im Blut kommen ¹¹⁴. Bei Serumproben besteht demnach eine hohe Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und TGF- β -Konzentration ¹¹⁵. Wir haben daher die TGF- β -Konzentration im Plasma bestimmt und außerdem spezielle "CTAD-Röhrchen" benutzt, die eine Mischung aus Natriumcitrat, Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol enthalten, welche die c-AMP-Konzentration der Thrombozyten anhebt und dadurch die *in vitro*-Plättchen-Aktivierung minimiert. Des Weiteren wurde auf eine schonende Blutentnahme geachtet. Dies wurde insbesondere durch eine kurze Stauzeit und Verwendung großvolumiger Kanülen erreicht. Zusätzlich wurde die Thrombozytenzahl als Variable in die Multivarianzanalyse einbezogen.

2.3.4.2 Prinzip

Seit seiner Einführung durch Engvall und Perlmann 1971 ¹¹⁶ fand der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) weltweite Verbreitung, da er sich als sichere und kostengünstige Alternative zum Radioimmuntest erwies und insbesondere bei diskontinuierlicher Probenentnahme und hohen Probenzahlen gegenüber anderen Immunoassaytechniken überlegen ist ¹¹⁷. Das Funktionsprinzip des ELISA beruht auf spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen und gekoppelten Enzymen durch die ein Farbumschlag ausgelöst wird.

Die Vertiefungen von 96-Well-Mikrotiterplatten sind mit Antikörpern, welche TGF- β 1 binden (Capture-Antikörper), beschichtet. Im ersten Schritt werden TGF- β 1-Moleküle, die sich in einer zu untersuchenden Probe befinden, durch

diese Antikörper gebunden. Alle nicht gebundenen Moleküle werden durch einen darauffolgenden Waschschrift entfernt. Anschließend wird ein zweiter Antikörper (Detection-Antikörper), welcher ein anderes Epitop des TGF- β 1-Moleküls erkennt und an ein Enzym gekoppelt ist, zugegeben. Durch einen zweiten Waschschrift werden diejenigen Detection-Antikörper entfernt, die nicht an – durch den Capture-Antikörper – gebundenes TGF- β 1 gebunden haben. Danach wird ein Substrat zugegeben, welches durch das am zweiten Antikörper gebundene Enzym umgesetzt wird. Es kommt zu einem Farbumschlag, der nach einer definierten Zeitspanne mittels einer Stopplösung unterbrochen und anschließend photometrisch gemessen wird. Die messbare Extinktion ist proportional zur Molekülkonzentration der Probe. Durch den Vergleich mit definierten TGF- β 1-Konzentrationen einer Standardlösung ist es möglich, eine Standardkurve zu erstellen, mit deren Hilfe die Molekülkonzentration in der Probe errechnet werden kann.

2.3.4.3 Aktivierung von TGF- β 1

Durch den ELISA wird nur aktives TGF- β 1 (siehe auch 1.4.2) gemessen. Um die TGF- β 1-Gesamtkonzentration in einer Probe zu messen, muss daher vor der Messung eine Aktivierung erfolgen. In Abhängigkeit vom Probenmaterial unterscheidet sich diese Aktivierungsprozedur.

Für die Aktivierung von TGF- β 1 im Plasma wird 0,1 ml plättchenarmes Plasma mit 0,1 ml 2,5 N Essigsäure / 10 M Urea versetzt. Anschließend wird die Probe gut gemischt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach Ende der Inkubationsphase wird die angesäuerte Probe durch Zugabe von 0,1 ml 2,7 N NaOH / 1 M HEPES neutralisiert. Die aktivierte Plasmaprobe wird dann vierfach (mit Reagent-Diluent[®]) verdünnt. Aufgrund der ausgeführten Prozeduren muss die gemessene TGF- β 1-Konzentration mit dem Faktor 12 multipliziert werden.

Für die Aktivierung von TGF- β 1 im Zellkulturüberstand werden zu 0,5 ml Überstand jeweils 0,1 ml 1N HCL hinzugegeben. Anschließend wird die Probe ge-

mischt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach Ende der Inkubationsphase wird die angesäuerte Probe durch Zugabe von 0,1 ml 1,2 N NaOH / 0,5 M HEPES wieder neutralisiert. Aufgrund der erfolgten Verdünnungsschritte muss die gemessene TGF- β 1-Konzentration mit dem Faktor 1,4 multipliziert werden.

2.3.4.4 Durchführung

- Blutplasma wurde – wie oben dargestellt (siehe 2.3.1) – gewonnen und nach Auftauen der bei -20 °C gelagerten Proben sowie TGF- β 1-Aktivierung (siehe 2.3.4.3) im ELISA eingesetzt.
- Kulturüberstand: die beiden Ansätze (\pm anti-CD3) der mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigten und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellten Lymphozyten (siehe 2.3.2) wurden unverzüglich auf eine 6-Well-Zellkulturplatte aufgebracht. Im Anschluss wurden die Proben bei 37 °C und 5% CO₂-Spannung für 72 Stunden inkubiert. Danach wurde der Kulturüberstand abpipettiert, bei -20 °C eingelagert und vor Durchführung des ELISA wieder aufgetaut. Anschließend erfolgte die TGF- β 1-Aktivierung (siehe 2.3.4.3).

Für den ELISA wurde zunächst eine 96-Well-TGF- β 1-Mikrotiterplatte mit einem als Primärantikörper eingesetzten polyklonalen Antikörper gegen TGF- β 1 beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer ungebundene Antikörper entfernt sowie unspezifische Bindungsstellen mittels einer einstündigen Einwirkzeit von Blockpuffer abgesättigt. Durch einen weiteren Waschschrift erfolgte die Entfernung des Blockpuffers. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 μ l Probe bzw. Standard je Well in Form von Doppelbestimmungen. Der TGF- β 1 Standard war zusammengesetzt aus rekombinantem humanen TGF- β 1 gelöst in Calibrator Diluent RD5I (bestehend aus einer gepufferten basischen Proteinlösung für Zellkulturüberstände) bzw. Calibrator Diluent RD6M (bestehend aus Tiereserum für Serum- & Plasma-Proben). Nach dreistündiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein erneuter Waschschrift. Danach

wurden 200 µl des peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers (Detection-Antikörper) zugegeben und für 1,5 Stunden inkubiert. Vor Zugabe von 200 µl Substratlösung folgte ein erneuter Waschschrift. Die Substratlösung war zusammengesetzt aus Farbreagenz A (bestehend aus 12,5 ml stabilisiertem Wasserstoffperoxid) und Farbreagenz B (bestehend aus 12,5 ml stabilisiertem Tetramethylbenzidin als Chromogen). Die folgende Inkubation von 20 min fand unter Lichtabschluss statt, da bei dieser Reaktion, welche chromogenes Substrat durch gebundene Peroxidase umsetzt, lichtreaktive Metabolite entstehen. Nach Abschluss der Inkubationsphase wurde der Reaktionsprozess durch Zugabe von 50 µl Stopplösung (bestehend 2 N Schwefelsäure) zum Stillstand gebracht und die Extinktion photometrisch mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Die Wellenlängenkorrektur zur Korrektur der optischen Eigenschaften der genutzten Assayplatten betrug 570 nm.

2.3.4.5 Kalkulation der Ergebnisse

Aus den Doppelbestimmungen für Standards und Proben wurden Mittelwerte berechnet. Von den Mittelwerten der Proben wurde die optische Dichte des Nullstandards (Standard ohne TGF-β) subtrahiert. Aus den Mittelwerten der Standards wurde eine Standardkurve ermittelt. Durch Vergleich der gemessenen Absorption der Proben mit der Standardkurve wurde unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors (siehe 2.3.4.3) die TGF-β1-Konzentration in den Proben berechnet.

2.3.5 Endothelin (1-21) ELISA

2.3.5.1 Prinzip

Mit dem von uns eingesetzten Endothelin (1-21) ELISA kann die ET-1-Konzentration in biologischen Flüssigkeiten wie Plasma, Harn oder

Zellkulturüberständen bestimmt werden. Endothelin 1-21 bezeichnet das physiologisch aktive Endothelin 1. Dieses entsteht durch Spaltung des 38 Aminosäuren langen bigET-1 mittels ECE in Endothelin 1-21 und das C-terminale Fragment (Aminosäuren 22-38).

Zunächst wird die Mikrotiterplatte mit einem immunaffinitäts-chromatographisch gereinigten polyklonalen Antikörper (Capture-Antikörper) beschichtet, welcher ET-1 bindet. Anschließend wird die Probe gemeinsam mit einem hochspezifischen, lyophilisierten, monoklonalen anti-ET-1-Detektionsantikörper von der Maus in das jeweilige Well pipettiert. Durch einen nachfolgenden Waschschrift werden ungebundene Substanzen entfernt. Danach wird ein dritter, mit Peroxidase konjugierter anti-Maus-Antikörper zugesetzt, welcher an den Detektionsantikörper bindet. Nach abermaligem Waschen erfolgt die Zugabe von Tetramethyl-Benzidin als Substrat. ET-1 wird durch eine Enzymkatalysierte Farbänderung detektierbar. Die entstandene Farbentwicklung, welche proportional zur Konzentration an ET-1 ist, kann photometrisch gemessen werden.

2.3.5.2 Durchführung

Je 200 µl Standard oder Probe wurden in das entsprechende, herstellerseits bereits Antikörper-beschichtete Well einer 96-well-Mikrotiterplatte gegeben. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Zugabe von je 50 µl Detektionsantikörper pro Well. Die Platte wurde dann mit einer Folie abgedeckt und für 16-24 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde der flüssige Inhalt der Wells verworfen und fünfmal mit 300 µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Nach Abklopfen der Platte erfolgte die Zugabe von je 200 µl Konjugat pro Well, welches den an Peroxidase gekoppelten anti-Maus IgG-Antikörper enthielt. Die Platte wurde erneut mit Folie abgedeckt und für eine Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Der flüssige Inhalt wurde im Anschluss verworfen und danach erneut fünfmal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dann wurden 200 µl Substrat (Tetramethyl-Benzidin) in jedes Well pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter

Lichtabschluss inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden 50 µl Stopplösung pro Well pipettiert und gut geschüttelt. Die Messung der Extinktion erfolgte unmittelbar anschließend bei 450 nm gegen 620 nm als Referenz.

2.3.5.3 Kalkulation der Ergebnisse

Aus den Doppelbestimmungen für Standards, Kontrollen und Proben wurden Mittelwerte berechnet. Der Absorptionswert des Nullstandards (Standard ohne ET-1) wurde von den Messwerten subtrahiert. Aus den Mittelwerten der Standards wurde eine Standardkurve erstellt. Anhand der Standardkurve konnte aus dem gemessenen Absorptionswert der Proben die ET-1-Konzentration berechnet werden.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS Version 13.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Sämtliche Ergebnisse sind als Median mit Standardabweichung dargestellt. Der Vergleich unabhängiger Stichproben erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (quantitative Werte) oder mit dem Chi-Quadrat-Test (qualitative Werte). Für die Untersuchung abhängiger Stichproben wurde der Wilcoxon-Test eingesetzt. Der Zusammenhang zweier Merkmale wurde mit Hilfe der Spearman Rang-Korrelation untersucht. Um den Zusammenhang einzelner Patienten-Charakteristika mit den gemessenen Werten zu untersuchen, wurde eine univariate Regressionsanalyse durchgeführt. Alle Parameter, die sich in dieser Analyse als prädiktiv erwiesen ($p < 0,20$), wurden anschließend in eine multivariate, logistische Regressionsanalyse eingeschlossen. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$) angesetzt. Ein $p < 0,05$ wurde somit als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

Die demographischen Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Verteilung der demographischen Daten

	Gruppe A (n = 35)	Gruppe B (n = 28)	Gruppe C (n = 6)
Spenderalter (Jahre)	50,0 ± 15,9	51,0 ± 13,9	43,0 ± 16,0
Empfängeralter (Jahre)	57,0 ± 12,7 *	42,5 ± 14,1	39,5 ± 9,1 #
Geschlecht (weiblich, %)	40,0	35,7 ‡	83,3 #
Alter des Transplantates (Monate)	46,0 ± 40,9 *	19,5 ± 15,9	36,0 ± 2,2
Diabetes mellitus (%)	37,1	17,9	33,3
Arterielle Hypertonie (%)	82,9	92,9	100
GFR (ml/min)	63,6 ± 20,0	67,5 ± 21,3	51,4 ± 18,5
Thrombozytenzahl (x10³/µl)	200,0 ± 96,3	221,5 ± 45,1	262,0 ± 53,3
Co-Medikation			
- ACE-Hemmer (%)	45,7 *	17,9	33,3
- Angiotensin-Rezeptor-Blocker (%)	8,6	3,6	16,7
- Calcium-Antagonist (%)	48,6	28,6	50,0
- Statin (%)	45,7 *	3,6 ‡	50,0

Die GFR wurde nach Cockcroft und Gault berechnet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test und mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet. *, P < 0,05 vs. Gruppe B; #, P < 0,05 vs. Gruppe A; ‡, P < 0,05 vs. Gruppe C.

Bei Auswertung der demographischen Daten ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Hinblick auf Empfängeralter, Geschlecht, Alter des Transplantates sowie die Co-Medikation mit ACE-Hemmern und Statinen.

3.2 Immunsuppressive Therapie und Therapeutic Drug Monitoring (TDM)

Um einer möglichen Verzerrung von Ergebnissen durch kleine Stichproben entgegenzuwirken, wurden von jedem Patienten drei Blutproben untersucht. Diese Blutproben wurden zu unterschiedlichen Terminen in unserer Poliklinik gewonnen. Die weitere statistische Auswertung der untersuchten Parameter erfolgte anhand des Mittelwertes aus den drei gewonnenen Proben.

CyA-, Tacrolimus- und Rapamycin-Spiegel wurden, wie beschrieben, an drei verschiedenen Untersuchungsterminen gemessen. Die CyA-Spiegel wurden zu den Zeitpunkten C0 (vor Einnahme) und C2 (2 Stunden \pm 10 Minuten nach Einnahme) bestimmt. Tacrolimus- und Rapamycin-Spiegel wurden ausschließlich zum Zeitpunkt C0 bestimmt. Zusätzlich wurde die MMF-Dosis dokumentiert.

Tabelle 2: Blutspiegel und Dosierung der immunsuppressiven Therapie

	Gruppe A (n = 35)	Gruppe B (n = 28)	Gruppe C (n = 6)
CyA C0 (ng/ml)	99,0 \pm 29,5 *		69,0 \pm 22,4
CyA C2 (ng/ml)	560,0 \pm 186,2		436,0 \pm 190,7
CyA AUC₍₀₋₂₎ (ng*h/ml)	3305,0 \pm 626,7 *		2674,5 \pm 642,2
Tacrolimus (ng/ml)		8,5 \pm 2,4	
Rapamycin (ng/ml)			5,5 \pm 3,7
MMF (mg/Tag)	2000,0 \pm 390,5 #	1000,0 \pm 491,7	

Die Area Under the Curve (AUC₍₀₋₂₎) wurde anhand der Formel $AUC = 990 + 10,74 \times C0 + 2,28 \times C2$ berechnet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test berechnet. *, P < 0,05 vs. Gruppe C; #, P < 0,05 vs. Gruppe B.

Innerhalb der drei Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der zu den drei verschiedenen Terminen gemessenen Medikamentenspiegel. In den Gruppen A und C bestand bei den CyA-Spiegeln eine signifikante Korrelation zwischen C0- und C2-Spiegel ($r = 0,436$, $P < 0,05$). Die Korrelation zwischen C2-Spiegel und AUC₍₀₋₂₎ ($r = 0,904$, $P < 0,01$) war erwartungsgemäß höher als die Korrelation zwischen C0-Spiegel und AUC₍₀₋₂₎

($r = 0,734$, $P < 0,01$). Die CyA-Spiegel zum Zeitpunkt C0 und die $AUC_{(0-2)}$ waren in Gruppe A höher als in Gruppe C. Auch die MMF-Dosis in Gruppe A war höher als die MMF-Dosis in Gruppe B.

3.3 TGF- β 1-Konzentration im Plasma

Die TGF- β 1-Plasmakonzentration wurde als Talspiegel aus Blutproben bestimmt, welche mit Hilfe von Vacutainer-CTAD Röhrchen gewonnen wurden. Durch diese Entnahmetechnik wurde der störende Einfluss der TGF- β 1-Freisetzung aus Thrombozyten im Rahmen der Blutgerinnung vermieden.

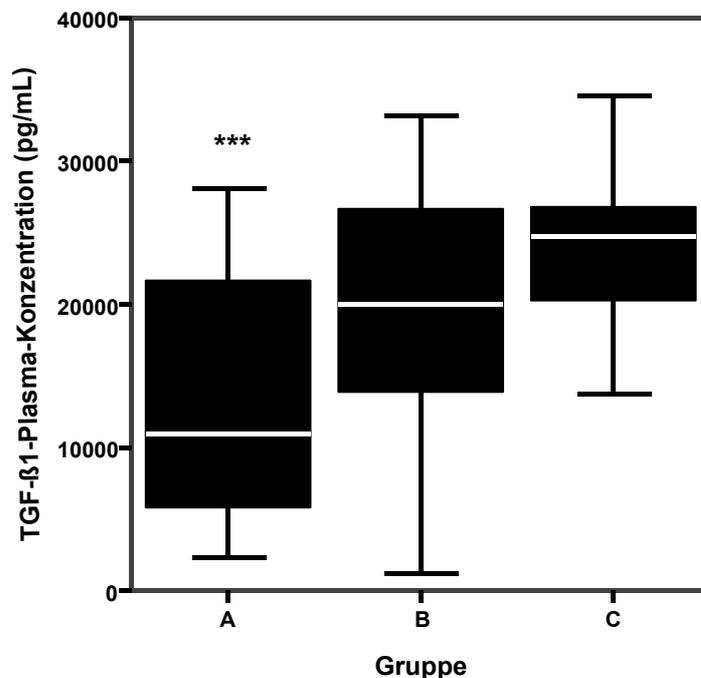


Abbildung 9: Dargestellt sind die Talspiegel der TGF- β 1-Plasmakonzentrationen in den einzelnen Gruppen als Boxplot. Der Vergleich der TGF- β 1-Plasmakonzentration zwischen den verschiedenen Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. ***, $P < 0,001$ vs. Gruppe B und C.

Die TGF- β 1-Plasmakonzentration in den Gruppen B und C war höher als die TGF- β 1-Plasmakonzentration in Gruppe A. Zwischen den Gruppen B und C bestanden keine signifikanten Unterschiede. Zusätzlich wurde untersucht, ob

die gemessenen TGF- β 1-Plasmakonzentrationen mit den Plasmaspiegeln der verschiedenen Immunsuppressiva korrelieren. Lediglich in Gruppe A wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem CyA-Spiegel zum Zeitpunkt C2 und der TGF- β 1-Konzentration im Plasma zum Zeitpunkt C0 gefunden ($r = 0,419$, $P < 0,05$). Darüber hinaus bestanden keine signifikanten Korrelationen. Ebenso war keine Korrelation zwischen MMF-Dosis und TGF- β 1-Plasmakonzentration festzustellen.

3.4 TGF- β 1-Konzentration im Zellkulturüberstand

Mit Hilfe der Ficoll Dichtegradienten-Zentrifugation wurden Lymphozyten isoliert und danach für 72 Stunden in An-/Abwesenheit stimulierender Antikörper gegen CD3 inkubiert. Die TGF- β 1 Konzentration im Zellkulturüberstand wurde anschließend mit Hilfe eines ELISA gemessen.

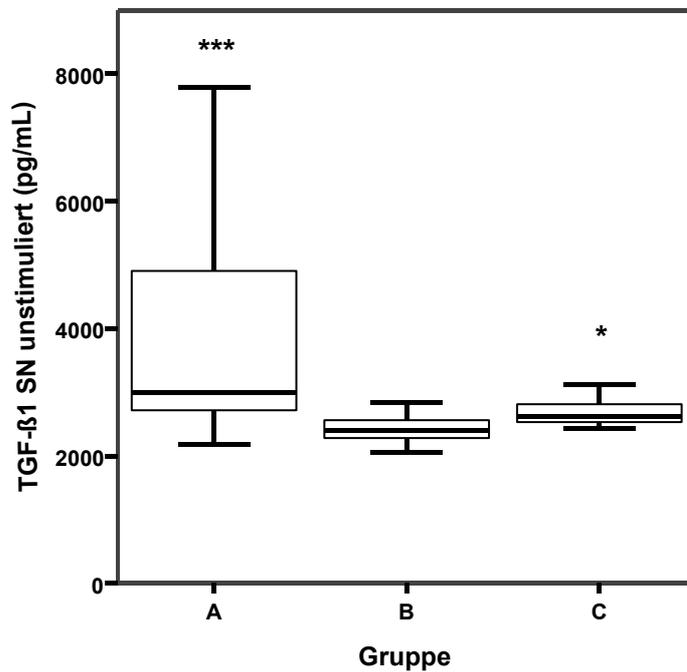


Abbildung 10: Dargestellt sind die Talspiegel der TGF- β 1-Konzentrationen im unstimulierten Kulturüberstand (SN) in den einzelnen Gruppen als Boxplot. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. *, $P < 0,05$ vs. Gruppe A und B. ***, $P < 0,001$ vs. Gruppe B.

Beim Vergleich der drei Gruppen stellte sich heraus, dass die TGF- β 1-Konzentration im unstimulierten Überstand in Gruppe A am höchsten war, gefolgt von Gruppe C und Gruppe B.

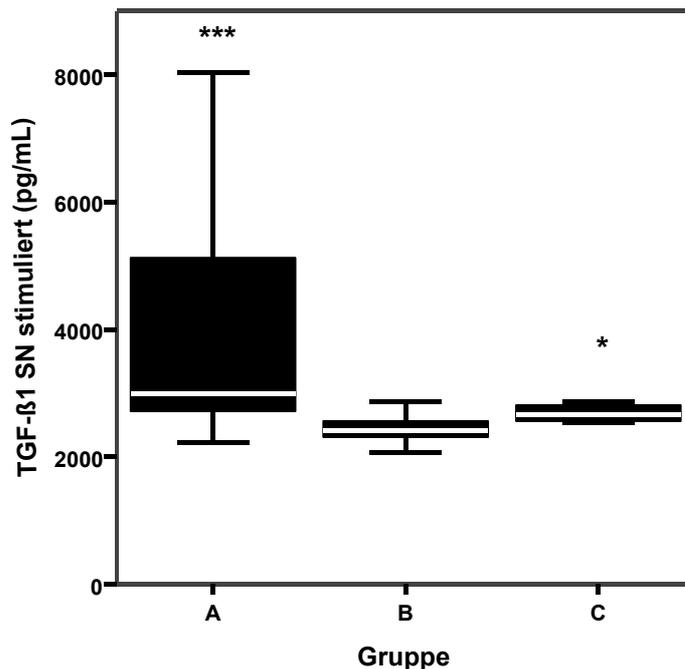


Abbildung 11: Dargestellt sind die Talspiegel der TGF- β 1-Konzentrationen im stimulierten Kulturüberstand (SN) in den einzelnen Gruppen als Boxplot. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. *, $P < 0,05$ vs. Gruppe A und B. ***, $P < 0,001$ vs. Gruppe B.

Auch die TGF- β 1-Konzentration im stimulierten Überstand war in Gruppe A am höchsten, gefolgt von Gruppe C und Gruppe B. Die beobachteten Unterschiede waren somit unabhängig von der Inkubation der Zellen mit oder ohne Antikörper gegen CD3. Durchschnittlich waren die TGF- β 1-Konzentrationen im Überstand nach Inkubation mit anti-CD3-Antikörpern höher als nach Inkubation ohne anti-CD3-Antikörper ($P < 0,05$, Wilcoxon-Test).

Zwischen den gemessenen Spiegeln sowie den verabreichten Dosierungen der immunsuppressiven Therapie und den TGF- β 1-Konzentrationen im Kulturüberstand wurden größtenteils keine signifikanten Korrelationen gefunden. Einzig die gemessenen Tacrolimus-Spiegel korrelierten schwach mit der TGF- β 1-Konzentration im Überstand anti-CD3-stimulierter Lymphozyten ($r = -0,428$, $P < 0,05$). Eine Korrelation zwischen den TGF- β 1-Konzentrationen im Zellkulturüberstand und den TGF- β 1-Konzentrationen im Plasma ließ sich nicht nachweisen.

3.5 Lymphozytenproliferation

Nach Isolierung der Lymphozyten mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die Lymphozyten für 72 Stunden in An-/Abwesenheit stimulierender Antikörper gegen CD3 inkubiert. Nach Ende der Inkubationsphase wurde die Zellproliferation mit Hilfe des MTT-Tests gemessen.

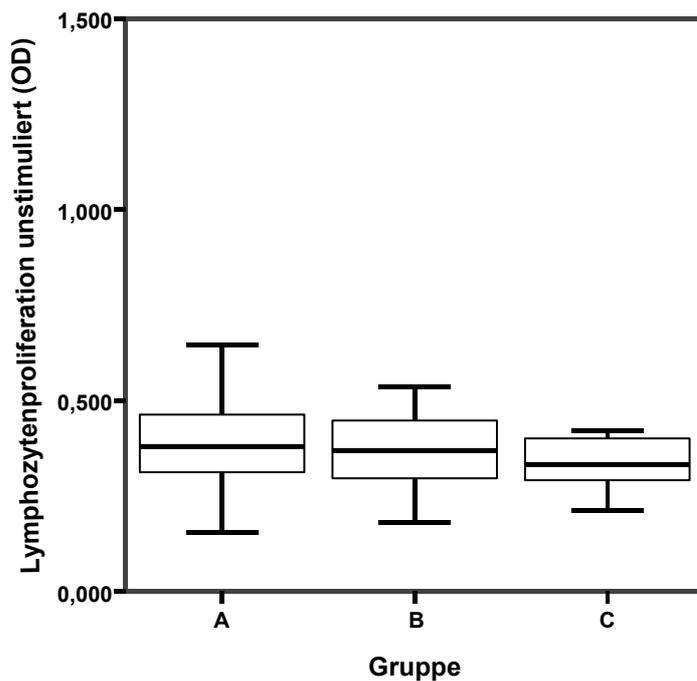


Abbildung 12: Dargestellt ist die Lymphozytenproliferation aus der Talspiegelblutentnahme (Zeitpunkt C0) nach 72h Inkubation in Abwesenheit von stimulierenden anti-CD3-Antikörpern in den einzelnen Gruppen als Boxplot. Der Vergleich der Lymphozytenproliferation zwischen den drei Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test. Abkürzung: OD, optical density.

Beim Vergleich der drei Gruppen hinsichtlich der unstimulierten Lymphozytenproliferation fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

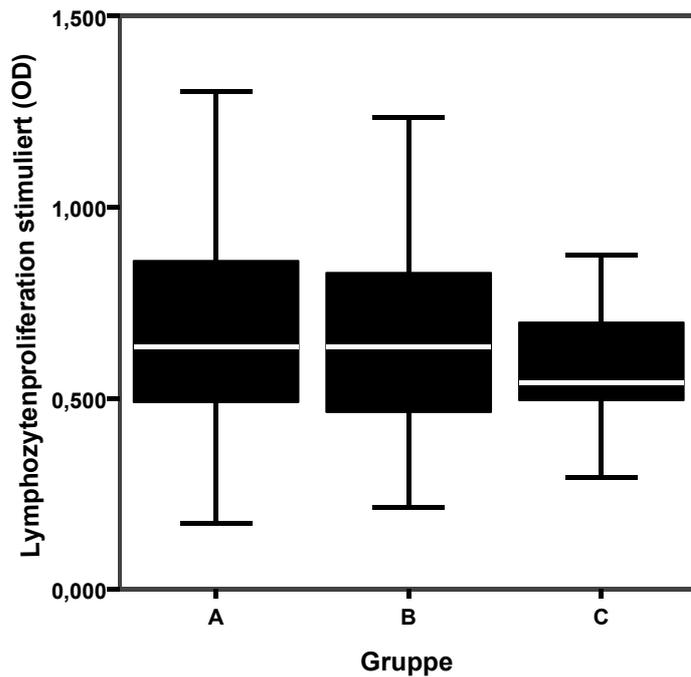


Abbildung 13: Dargestellt ist die Lymphozytenproliferation nach 72h Inkubation in Anwesenheit von stimulierenden anti-CD3-Antikörpern in den einzelnen Gruppen als Boxplot. Der Vergleich der Lymphozytenproliferation zwischen den drei Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test. Abkürzung: OD, optical density.

Auch beim Vergleich der drei Gruppen hinsichtlich der stimulierten Lymphozytenproliferation fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Unterschied zwischen stimulierter und unstimulierter Lymphozytenproliferation war in allen drei Gruppen signifikant. Zwischen unstimulierter und stimulierter Lymphozytenproliferation bestand eine signifikante Korrelation ($r = 0,617$, $P < 0,05$).

Die Untersuchungen zur Korrelation zwischen Lymphozytenproliferation und Medikamenten-Spiegel / -Dosierungen ergaben eine signifikante Korrelation zwischen dem CyA-Spiegel zum Zeitpunkt C2 ($r = -0,443$, $P < 0,05$) sowie der $AUC_{(0-2)}$ ($r = -0,425$, $P < 0,05$) und der stimulierten Lymphozytenproliferation in Gruppe A. Alle anderen Untersuchungen ergaben diesbezüglich keine signifikanten Korrelationen. Zwischen Lymphozytenproliferation und TGF- β 1-Plasmakonzentration bzw. TGF- β 1-Konzentration im Kulturüberstand ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Korrelationen.

3.6 Endothelin-1-Konzentration im Plasma

Die Endothelin-1-Konzentration im Plasma der Patienten wurde mittels ELISA bestimmt.

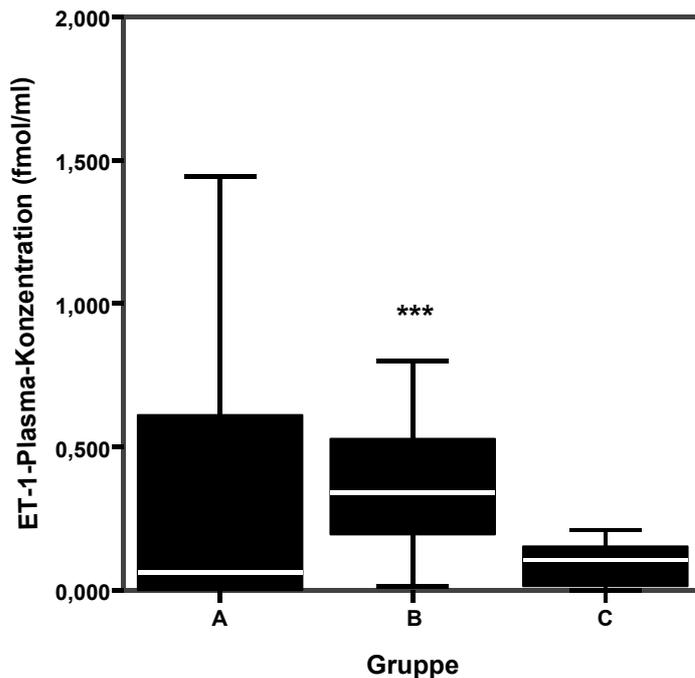


Abbildung 14: Dargestellt ist die Endothelin-1 (ET-1) -Konzentration im Plasma während des Talspiegels (Zeitpunkt C0) in den einzelnen Gruppen als Boxplot. Der Vergleich zwischen den drei Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test. ***, $P < 0,001$ vs. Gruppe A und C.

Beim Vergleich der drei Gruppen hinsichtlich der ET-1-Konzentration im Plasma zeigte sich in Gruppe B eine signifikant höhere ET-1-Konzentration als in den Gruppen A und C. Anzumerken ist hierbei jedoch, dass insbesondere bei dieser Untersuchung die Streuung der Messwerte relativ hoch war.

Die Untersuchung im Hinblick auf mögliche Korrelationen zwischen der ET-1-Plasma-Konzentration und den Medikamenten-Spiegeln / -Dosierungen ergab eine signifikante negative Korrelation zwischen Rapamycin-Spiegel und der ET-1-Plasma-Konzentration ($r = -1,0$, $P < 0,05$) in Gruppe C. Darüber hinaus wurden in dieser Gruppe ebenso wie in den beiden anderen Gruppen keine signifikanten Korrelationen gefunden. Zusätzlich fand sich in Gruppe C auch

eine signifikante Korrelation zwischen ET-1-Plasma-Konzentration und TGF- β 1-Plasma-Konzentration ($r = -0,880$, $P < 0,05$). In Bezug auf die weiteren Messparameter (TGF- β 1-Plasma-Konzentration, TGF- β 1-Konzentration im Kulturüberstand und Lymphozytenproliferation) wurden keine weiteren, statistisch signifikanten Korrelationen festgestellt, weder in Gruppe C noch in den beiden anderen Gruppen.

3.7 Einfluss demographischer Faktoren

Nachfolgend wurden verschiedene demographische Faktoren im Hinblick auf ihren Einfluss auf die gemessenen Parameter untersucht.

3.7.1 Univariate Analyse

Zunächst wurde der Einfluss der demographischen Faktoren auf die gemessenen Parameter in einer univariaten Analyse untersucht.

Tabelle 3: Korrelation demographischer Faktoren mit den untersuchten Messparametern

	TGF- β 1 P	TGF- β 1 SN	TGF- β 1 sSN	LyPr	sLyPr	ET-1
Spenderalter	0,885	0,408	0,875	0,630	0,813	0,471
Empfängeralter	0,096	0,478	0,048	0,135	0,353	0,171
Geschlecht	0,813	0,307	0,259	0,337	0,146	0,427
Zeit nach NTx	0,083	0,001	0,001	0,933	0,237	0,136
Diabetes mellitus	0,893	0,107	0,040	0,463	0,293	0,435
Arterielle Hypertonie	0,077	0,165	0,849	0,442	0,426	0,166
GFR	0,216	0,421	0,030	0,939	0,376	0,084
Thrombozytenzahl	0,076	0,816	0,216	0,903	0,920	0,050
Co-Medikation						
- ACE-Hemmer	0,780	0,333	0,055	0,302	0,558	0,511
- ARB	0,285	0,418	0,597	0,034	0,677	0,116
- Calcium-Antagonist	0,398	0,779	0,485	0,063	0,197	0,078
- Statin	0,951	0,068	0,020	0,521	0,155	0,017

Der univariate Zusammenhang zwischen den einzelnen demographischen Faktoren und den untersuchten Messparametern wurde mittels Mann-Whitney U-Test und Spearman Rang-Korrelation untersucht. Faktoren, bei denen die statistische Auswertung ein $P < 0,20$ ergab, wurden zur besseren Übersicht fett gedruckt.

Abkürzungen: NTx, Nierentransplantation; GFR, glomeruläre Filtrationsrate; ARB, Angiotensin Rezeptor Blocker; TGF- β 1 P, TGF- β 1-Konzentration im Plasma; TGF- β 1 SN, TGF- β 1-Konzentration im unstimulierten Überstand; TGF- β 1 sSN, TGF- β 1-Konzentration im stimulierten Überstand; LyPr, unstimulierte Lymphozytenproliferation; sLyPr, stimulierte Lymphozytenproliferation.

Diejenigen demographischen Faktoren, welche sich in der univariaten Analyse als prädiktiv für den jeweiligen Messparameter erwiesen ($P < 0,20$), wurden in die multiple Regressionsanalyse aufgenommen.

3.7.2 Multiple lineare Regressionsanalyse

In der multiplen Regressionsanalyse wurde das Merkmal Gruppenzugehörigkeit unterteilt in die beiden Merkmale CyA vs. Tacrolimus und MMF vs. Rapamycin.

Tabelle 4: Korrelation demographischer Faktoren mit den untersuchten Messparametern

	TGF-β1 P	TGF-β1 SN	TGF-β1 sSN	LyPr	sLyPr	ET-1
CyA vs. Tacrolimus	0,011	0,0001	0,002	0,376	0,552	0,188
MMF vs. Rapa	0,014	0,029	0,011	0,369	0,314	0,189
Spenderalter						
Empfängeralter	0,614		0,047	0,882		0,367
Geschlecht					0,413	
Zeit nach NTx	0,535	0,936	0,889			0,330
Diab. Mellitus		0,695	0,116			
Art. Hypertonie	0,186	0,674				0,404
GFR			0,375			0,636
Thrombozytenzahl	0,083					0,314
Co-Medikation						
- ACE-Hemmer			0,795			
- ARB				0,100		0,667
- Ca-Antagonist				0,174	0,821	0,448
- Statin			0,268		0,392	0,768

Abkürzungen: CyA, Cyclosporin A; MMF, Mycophenolatmofetil; Rapa, Rapamycin; NTx, Nierentransplantation; GFR, glomeruläre Filtrationsrate; ARB, Angiotensin Rezeptor-Blocker; TGF- β 1 P, TGF- β 1-Konzentration im Plasma; TGF- β 1 SN, TGF- β 1-Konzentration im unstimulierten Überstand; TGF- β 1 sSN, TGF- β 1-Konzentration im stimuliertem Überstand; LyPr, unstimulierte Lymphozytenproliferation; sLyPr, stimulierte Lymphozytenproliferation; ET-1, Endothelin-1 Plasmakonzentration. Fett gedruckt: Faktoren, die in der Analyse ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ erreichten.

Die multiple Regressionsanalyse bestätigte einen signifikanten Einfluss der immunsuppressiven Therapie auf die TGF- β 1-Plasmakonzentration und auf die TGF- β 1-Konzentration im Zellkulturüberstand. Demgegenüber konnte ein signifikanter Einfluss auf die ET-1-Plasmakonzentration nicht bestätigt werden. In Bezug auf die Lymphozytenproliferation konnte in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Analysen (siehe 3.5) kein Zusammenhang mit der immunsuppressiven Therapie festgestellt werden.

Hinsichtlich der demographischen Faktoren konnte lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Empfängeralter und TGF- β 1-Konzentration im stimulierten Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Alle anderen demographischen Faktoren hatten keinen nachweisbaren Einfluss auf die gemessenen Parameter.

3.8 Klinischer Verlauf

Im Folgenden wurden die drei Gruppen im Hinblick auf klinisch relevante Verlaufsparemeter untersucht.

3.8.1 Transplantatfunktion

Tabelle 5: Serum-Kreatinin-Werte im zeitlichen Verlauf

	2001	2002	2003	2004	Δ 2001 – 2004
Gruppe A	1,41 \pm 0,88	1,62 \pm 0,49	1,54 \pm 0,55	1,72 \pm 0,54 *	+ 11,3 \pm 38,6 *
Gruppe B	1,32 \pm 0,67	1,40 \pm 0,85	1,42 \pm 1,13	1,34 \pm 0,54	– 0,1 \pm 38,2
Gruppe C	1,34 \pm 0,46	1,40 \pm 0,62	1,56 \pm 0,47	1,71 \pm 0,35	+ 20,2 \pm 32,3

In den Spalten "2001" bis "2004" sind die durchschnittlichen Serum-Kreatinin-Werte pro Jahr in mg/dl angegeben. In der Spalte " Δ 2001 – 2004" sind die Änderungen der Serum-Kreatinin-Werte zwischen 2001 und 2004 in % angegeben; der Wert wurde nach folgender Formel berechnet: $[(S\text{-Kreatinin}_{2004}) - (S\text{-Kreatinin}_{2001}) : S\text{-Kreatinin}_{2001}] \times 100 = \Delta$ 2001 – 2004 (%). * $P < 0,05$ vs. Gruppe B.

Der durchschnittliche Serum-Kreatinin-Wert in Gruppe A war im Jahre 2004 signifikant höher als in Gruppe B. Zusätzlich war auch die Veränderung der durchschnittlichen Serum-Kreatinin-Werte von 2001 bis 2004 zwischen Gruppe A und Gruppe B signifikant unterschiedlich, d.h., der Anstieg der Serum-Kreatinin-Werte in Gruppe A im zeitlichen Verlauf war höher als in Gruppe B. Darüber hinaus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Zu berücksichtigen ist das durchschnittliche "Alter des Transplantates" bei Einschluss in die Untersuchung in Gruppe A (46,0 \pm 40,9 Monate) im Vergleich zu Gruppe B (19,5 \pm 15,9 Monate).

3.8.2 Chronische Transplantatnephropathie

Bei insgesamt 15 von 69 Patienten (21,7%) wurde eine Punktion der Transplantatniere wegen einer Verschlechterung der Nierenfunktion

durchgeführt. Die Diagnose chronische Transplantatnephropathie wurde bei 12 Patienten (17,4%) gestellt. Jeweils einmal wurde die Diagnose schwere tubulointerstitielle Nephritis infektiöser Genese (siehe auch 3.8.3), hypertensive Nephropathie und Polyoma BK-Virus-Nephropathie gestellt. Die Verteilung der jeweiligen Diagnosen auf die drei Gruppen ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Histologisch gesicherte Diagnosen (n=)

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
Chronische Transplantatnephropathie	8	3	1
Tubulointerstitielle Nephritis	1		
Hypertensive Nephropathie	1		
Polyoma BK-Virus-Nephropathie		1	

Zwischen den Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit der bioptisch gesicherten Diagnose chronische Transplantatnephropathie (Chi-Quadrat-Test).

Anschließend wurde untersucht, ob sich Patienten mit der histologisch gesicherten Diagnose chronische Transplantatnephropathie – unabhängig von der immunsuppressiven Therapie – im Hinblick auf die untersuchten Messparameter von den anderen Patienten unterscheiden.

Tabelle 7: Abhängigkeit der Messparameter von der Diagnose chronische Transplantatnephropathie (CAN)

	CAN – (n = 57)	CAN + (n = 12)
TGF-β1 P (pg/ml)	14772,0 ± 8729,1	14657,5 ± 9191,8
TGF-β1 SN (pg/ml)	2672,0 ± 1298,5	2577,1 ± 962,7
TGF-β1 sSN (pg/ml)	2644,7 ± 1505,0	2689,3 ± 884,1
LyPr (OD)	0,383 ± 0,158	0,387 ± 0,058
sLyPr (OD)	0,573 ± 0,314	0,639 ± 0,302
ET-1 (fmol/ml)	0,248 ± 3,679	0,064 ± 0,167

Dargestellt sind die im Rahmen der Studie untersuchten Parameter in Abhängigkeit von der histologisch gesicherten Diagnose chronische Transplantatnephropathie. Abkürzungen: CAN, chronic allograft nephropathy = chronische Transplantatnephropathie; TGF-β1 P, TGF-β1-Konzentration im Plasma; SN, unstimulierter Überstand; sSN, stimulierter Überstand; LyPr, unstimulierte Lymphozytenproliferation; sLyPr, stimulierte Lymphozytenproliferation; ET-1, Endothelin-1-Konzentration im Plasma.

Hinsichtlich der untersuchten Messparameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Diagnose chronische Transplantatnephropathie (Mann-Whitney U-Test).

3.8.3 Transplantatüberleben

Insgesamt waren im Beobachtungszeitraum (2001 – 2004) fünf Transplantatverluste zu verzeichnen (7,25%). Davon verstarben zwei Patienten mit funktionierendem Transplantat und drei Patienten kehrten zurück an die chronische Hämodialysebehandlung. Ein Patient verstarb zu Hause, vermutlich an einem kardialen Ereignis. Der zweite Patient verstarb nach einer operativen Prozedur. Bei allen drei Transplantatverlusten "im engeren Sinne" wurden die Nieren histologisch untersucht und die jeweilige Diagnose gesichert. Bei zwei Patienten lag eine chronische Transplantatnephropathie vor und bei einer Patientin war eine schwere tubulointerstitielle Nephritis infektiöser Genese die Ursache für den Transplantatverlust. Eine statistische Auswertung wurde angesichts der insgesamt niedrigen Anzahl von Ereignissen nicht vorgenommen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die vielschichtige Rolle von TGF- β 1 und ET-1 bei nierentransplantierten Patienten mit stabiler Transplantatfunktion untersucht. Schwerpunkt war die Untersuchung des Effektes der immunsuppressiven Erhaltungstherapie auf das Ausmaß der Expression von TGF- β 1 und ET-1. Da vermutet wird, dass ein Teil des immunsuppressiven Effektes von Calcineurin-Inhibitoren über die vermehrte Expression von TGF- β 1 vermittelt wird, wurde außerdem die Lymphozytenproliferation als Maß für die immunologische Aktivität bestimmt. Der schwierigen Pharmakokinetik von CyA wurde Rechnung getragen indem neben den üblichen C0-Messungen im Rahmen der Routine-Nachsorge auch C2-Messungen sowie die Berechnung der AUC durchgeführt wurden. Zusätzlich wurden demographische Faktoren, Co-Morbidität, Nierenfunktion und die relevante Co-Medikation in die Untersuchung einbezogen. Abschließend wurde der klinische Verlauf mit den gewonnenen Ergebnissen verglichen.

4.1 Konzeption

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag – wie bereits erwähnt – auf der Messung von C2-CyA-Spiegeln. Es war daher notwendig, eine entsprechende Routine bei der ambulanten Betreuung der Patienten zu etablieren. Dies bedeutete sowohl für das medizinische Personal als auch für die Patienten eine nicht unerhebliche Umstellung im zeitlichen Ablauf der Termine. Als besonders schwierig erwies sich die Einhaltung des Zeitfensters von $2 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ nach Einnahme. Da dies aufgrund systembedingt beschränkter Ressourcen nicht immer möglich war, mussten mehrere Proben verworfen und nachfolgend wiederholt werden. Aufgrund dieser praktischen Erfahrungen kann die C2-Blutentnahme als alleiniges Element des routinemäßigen, ambulanten CyA-Monitorings nicht uneingeschränkt empfohlen werden.

Der Bestimmung von TGF- β 1 Plasmaspiegeln nach Nierentransplantation wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen¹¹⁸⁻¹²¹ nachgegangen. Diese

Studien weisen jedoch teilweise methodische Schwachpunkte auf, insofern als dass (i) die Effekte der immunsuppressiven Therapie nicht immer eindeutig abgrenzbar sind und (ii) demographische Faktoren, (iii) Co-Morbidität, (iv) Nierenfunktion, (v) Co-Medikation sowie (vi) klinische Daten in Bezug auf die Transplantatfunktion nicht (ausreichend) berücksichtigt werden.

Bei der vorliegenden Untersuchung entschieden wir uns daher zum Vergleich von Gruppen nierentransplantierte Patienten mit immunsuppressiver Zweifachtherapie, die sich entweder in Bezug auf den verabreichten Calcineurin-Inhibitor (CyA vs. Tacrolimus) oder in Bezug auf das zweite Immunsuppressivum (MMF vs. Rapamycin) unterschieden. Zusätzlich wurden demographische Faktoren, Co-Morbidität, Nierenfunktion und die Co-Medikation in die Analyse einbezogen. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit klinischen Parametern der Transplantatfunktion verglichen.

Um dem Problem der Verzerrung von Ergebnissen durch kleine Stichproben entgegenzuwirken, wurden von jedem Patienten drei Blutproben untersucht, welche zu unterschiedlichen Terminen in unserer Poliklinik gewonnen wurden. Zur weiteren statistischen Auswertung nutzten wir den Mittelwert der drei gewonnenen Blutproben.

4.2 Blutentnahmetechnik

Zur Validierung der Bestimmung von TGF- β 1-Plasmakonzentrationen verglichen Coupes BM et al. die Blutentnahme mit dem Vacutainersystem mit einem speziellen Verfahren zur Vermeidung der Plättchenaktivierung¹²². Bei Anwendung des Verfahrens zur Minimierung des Blutentnahmetraumas zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der TGF- β 1-Plasmakonzentration zwischen CyA- und Tacrolimus-behandelten Patienten. Dagegen wurden bei der Vacutainer-Versuchsreihe erhöhte TGF- β 1-Plasma-Konzentrationen in der CyA-Gruppe festgestellt. Wurden diese TGF- β 1 Werte jedoch anschließend – durch Messung der β -Thromboglobulin-(β TG)-Spiegel, einem Marker der Plättchendegranulation – normalisiert in Bezug auf den Grad der Plättchenaktivierung, so war auch hier kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen mehr nachweisbar. Als Ursachen für die primär unterschiedlichen Mess-

ergebnisse diskutieren die Autoren die intrinsische Plättchenstabilität, den Grad des Traumas bei der Blutentnahme und die totale Plättchenzahl. In weiteren Arbeiten konnte bestätigt werden, dass CyA in der Tat die Plättchenreaktivität erhöht ¹²³ während dies bei Tacrolimus und Rapamycin nicht der Fall ist ¹²⁴. Aus unserer Sicht ist festzuhalten, dass die durch die CyA-Einnahme erhöhte Plättchenreaktivität auch in vivo eine Rolle spielen kann.

Wir gingen in der vorliegenden Untersuchung auf die Problematik ein, indem (i) die Blutentnahme durch erfahrenes Personal schonend durchgeführt wurde, (ii) die TGF- β 1-Konzentration im Plasma statt im Serum gemessen wurde, (iii) spezielle CTAD-Vacutainer-Röhrchen benutzt wurden, welche die Thrombozyten-Inhibitoren Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol enthalten und (iv) die Thrombozytenzahl in die Regressionsanalyse einbezogen wurde.

4.3 Führen Unterschiede in der immunsuppressiven Therapie zu unterschiedlichen TGF- β 1-/ET-1-Konzentrationen im Plasma?

Zwischen den drei Untersuchungsgruppen fanden sich signifikante Unterschiede in der Höhe der TGF- β 1 Plasmakonzentrationen. Während Gruppe A im Vergleich zu den Gruppen B und C die niedrigste TGF- β 1 Plasmakonzentration aufwies, zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen B und C. Der niedrigere TGF- β 1-Spiegel in Gruppe A gegenüber Gruppe B ist kongruent zu einer Studie von Miyagi et al. ¹²⁵. Im Gegensatz hierzu beschreibt eine Untersuchung von Citterio et al. ¹¹⁸ höhere TGF- β 1-Spiegel unter CyA im Vergleich zu Patienten, welche mit Tacrolimus bzw. Sirolimus behandelt wurden. Die Unterschiede in der Höhe der TGF- β 1-Spiegel sind möglicherweise durch die Art der Blutentnahmetechnik, bei welcher wir bewusst auf eine besonders schonende Gewinnung des Probenmaterials achteten, und durch Unterschiede in der Wahl des Patientenkollektivs erklärbar.

Aufgrund der inzwischen unbestrittenen Bedeutung von Calcineurin-Inhibitoren für die Pathogenese der chronischen Transplantatnephropathie werden derzeit immunsuppressive Strategien entwickelt, welche mit geringeren Dosen oder unter völligem Verzicht auf Calcineurin-Inhibitoren ¹²⁶ wirksam Rejektionen verhindern sollen. Erste Studienprotokolle, welche durch den Einsatz von

Rapamycin eine Dosisreduktion der Calcineurin-Inhibitoren zum Ziel haben, sind bezüglich der Inzidenz akuter Rejektionen durchaus Erfolg versprechend¹⁰⁷. Bei Patienten unter einer Kombinationstherapie mit CyA und Rapamycin zeigte sich allerdings, insbesondere bei längeren Untersuchungszeiträumen, eine erhöhte Inzidenz der CNI-Nephrotoxizität und eine verstärkte Hyperlipidämie¹²⁷. In Übereinstimmung mit Untersuchungen an Lymphozytenkulturen¹²⁸ und im Tiermodell¹²⁹ fanden wir unter einer Kombinationstherapie mit CyA und Rapamycin erhöhte TGF- β 1-Konzentrationen. Dieser Befund könnte eine mögliche Ursache für die erhöhte Inzidenz der CNI-Nephrotoxizität¹²⁷ bei Patienten unter einer Kombinationstherapie mit CyA und Rapamycin sein.

Die Expression von Endothelin unterliegt einer komplexen Steuerung durch verschiedenste Faktoren. TGF- β ist einer der stärksten Stimuli für die ET-1-Expression in Endothelzellen¹³⁰. Die TGF- β -abhängige Steigerung der ET-1 mRNA-Transkription erfolgt rasch mit einem Maximum nach ca. zwei bis vier Stunden. Eine längere Exposition gegenüber TGF- β führt nicht zu einer weiteren Steigerung der ET-1 mRNA-Transkription, bewirkt aber eine längere Persistenz der erhöhten ET-1-Konzentrationen¹³¹.

Dementsprechend fanden wir in Gruppe B höhere ET-1-Plasmakonzentrationen als in Gruppe A. Da auch in Gruppe C signifikant höhere TGF- β 1-Plasmakonzentrationen als in Gruppe A vorlagen, wäre zu erwarten gewesen, dass die ET-1-Plasmakonzentrationen in Gruppe C ebenfalls höher sind als in Gruppe A. Dies war jedoch nicht der Fall. Es bestand eine negative Korrelation zwischen TGF- β 1-Plasmakonzentration und ET-1-Plasmakonzentration in Gruppe C. Rapamycin interagiert an verschiedenen Stellen mit dem Endothelin-System. Es vermindert beispielsweise das ET-vermittelte Gefäßwachstum¹³² und den Einfluss von ET auf den Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α)¹³³. Es kann daher spekuliert werden, dass Rapamycin selbst oder ein nachgeordneter Mechanismus die TGF- β 1-induzierte ET-1-Expression inhibiert. Dementsprechend beschreiben Ramzy et al.¹³⁴ ebenfalls erniedrigte ET-1-Plasmakonzentrationen unter Behandlung mit Rapamycin im Vergleich zu CyA. Insgesamt muss bei den Ergebnissen der ET-1-Messungen die sehr hohe Streuung der ET-1-Plasmakonzentrationen einschränkend berücksichtigt werden.

4.4 Führen Unterschiede in der immunsuppressiven Therapie zu unterschiedlichen TGF- β 1-Konzentrationen im Überstand kultivierter T-Zellen?

Wie bereits in der Einleitung erwähnt ist eine Vielzahl von verschiedenen Zellen im Organismus in der Lage, TGF- β 1 zu produzieren. Wir gingen der Frage nach, ob die TGF- β 1-Produktion isolierter Lymphozyten das Ergebnis der gemessenen TGF- β 1-Plasmakonzentrationen widerspiegelt.

Aus dem peripheren Blut der Patienten wurden Lymphozyten isoliert und danach in An-/Abwesenheit stimulierender Antikörper gegen CD3 inkubiert. Im Kulturüberstand der Lymphozyten aus den entsprechenden Behandlungsgruppen war die TGF- β 1-Konzentration sowohl mit als auch ohne Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern in Gruppe A höher als in den Gruppen B und C. Des Weiteren war die TGF- β 1-Konzentration in Gruppe C im unstimulierten und im stimulierten Überstand geringfügig höher als in Gruppe B. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren demnach unabhängig von der Inkubation mit oder ohne stimulierenden Antikörper. Generell war die TGF- β 1-Konzentration nach Inkubation mit anti-CD3-Antikörper-Stimulation höher als ohne Stimulation.

Bemerkenswert ist, dass sich die TGF- β 1-Konzentration im Kulturüberstand im Vergleich zum Patientenplasma nahezu gegensätzlich verhielt. Aus diesem vordergründigen Widerspruch muss geschlossen werden, dass die in vivo gemessenen TGF- β 1-Plasmakonzentrationen – wie vermutet – nicht ausschließlich aus der TGF- β 1-Produktion von Lymphozyten resultieren.

4.5 Korreliert die Höhe der gemessenen Medikamentenspiegel mit der Höhe der TGF- β 1-/ET-1-Plasmakonzentrationen?

Eine Korrelation zwischen dem CyA-Spiegel und der TGF- β 1-Plasmakonzentration ließ sich nur für den CyA-Spiegel zum Zeitpunkt C2 der Gruppe A (CyA + MMF) nachweisen. Zwischen CyA-Spiegel zum Zeitpunkt C0 sowie AUC und der TGF- β 1-Plasmakonzentration ließen sich keine Korrelationen nachweisen. Ebenso bestanden zwischen den weiteren Medikamentenspiegeln

(Tacrolimus oder Rapamycin) und -dosierungen (MMF) auf der einen Seite und den TGF- β 1-Plasmakonzentrationen auf der anderen Seite keine Korrelationen. In Gruppe C fand sich eine negative Korrelation zwischen dem Rapamycin-Spiegel und der ET-1-Plasma-Konzentration. Darüber hinaus waren zwischen ET-1-Plasma-Konzentrationen und Medikamentenspiegeln (CyA, Tacrolimus oder Rapamycin) bzw. -dosierungen (MMF) keine signifikanten Korrelationen vorhanden.

4.6 Korreliert die Höhe der messbaren Medikamentenspiegel mit der Höhe der TGF- β 1-Konzentration im Überstand?

Eine Korrelation zwischen TGF- β 1-Plasmakonzentrationen und TGF- β 1-Konzentrationen im Kulturüberstand war nicht nachweisbar.

Eine signifikante Korrelation zwischen Medikamentenspiegeln bzw. -dosierung und TGF- β 1-Konzentrationen im Kulturüberstand fand sich lediglich in Gruppe B. In dieser Gruppe zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Tacrolimus-Spiegeln und TGF- β 1-Konzentrationen im Kulturüberstand anti-CD3-stimulierter Lymphozyten. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fanden Khanna et al ¹³⁵ eine erhöhte TGF- β 1-Expression bei Inkubation aktivierter humaner T-Lymphozyten in Anwesenheit von Tacrolimus. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass bei diesen Versuchen die Zellen - im Unterschied zu unserem System - in vitro mit Tacrolimus inkubiert wurden. Weitere signifikante Korrelationen zwischen TGF- β 1-Konzentrationen im Kulturüberstand und Medikamentenspiegel bzw. -dosierungen war nicht nachweisbar.

4.7 Korrelieren die Dosierungen/Konzentrationen der immunsuppressiven Medikation oder die gemessenen TGF- β 1-Konzentrationen mit der messbaren Lymphozytenproliferation?

Sowohl die unstimulierte als auch die stimulierte Lymphozytenproliferation war zwischen den drei verschiedenen Gruppen nicht unterschiedlich. Dagegen war in allen drei Gruppen die stimulierte Lymphozytenproliferation höher als die unstimulierte Lymphozytenproliferation. Die Untersuchungen zur Korrelation zwischen Medikamentenspiegeln (CyA, Tacrolimus, Rapamycin) bzw. Medikamentendosierungen (MMF) und Lymphozytenproliferation ergaben eine negative Korrelation zwischen den CyA-C2-Spiegeln sowie der AUC und der stimulierten Lymphozytenproliferation in Gruppe A. Darüber hinaus bestanden keine signifikanten Korrelationen. Ebenso bestanden keine signifikanten Korrelationen zwischen der Lymphozytenproliferation einerseits und den TGF- β 1-Konzentrationen im Plasma bzw. im Kulturüberstand andererseits. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich der immunsuppressive Effekt von TGF- β 1 nicht in der ex vivo gemessenen Lymphozytenproliferation widerspiegelt.

4.8 Welchen Einfluss haben weitere Variablen auf die gemessenen Parameter?

Es wird vermutet, dass neben der immunsuppressiven Therapie weitere Faktoren einen Einfluss auf die untersuchten Parameter haben. In einigen Systemen konnte beispielsweise für die Produktion verschiedener Zytokine geschlechtsspezifische Unterschiede nachgewiesen werden ^{136, 137}, während dies in anderen Systemen nicht der Fall war ¹³⁸. Weiterhin wird eine vermehrte Expression von TGF- β 1 mit der Entwicklung von Komplikationen beim Diabetes mellitus assoziiert ¹³⁹. Das Renin-Angiotensin-System wird als eine der Hauptursachen für die fortschreitende Sklerosierung der Niere angesehen ¹⁴⁰. Demzufolge gelten ACE-Hemmer und Angiotensin-Rezeptor-Blocker als

Wirkstoffe, die das Fortschreiten von Sklerosierungen verlangsamen können. Dies wurde in verschiedenen Studien mit einer Senkung der TGF- β 1-Expression in Verbindung gebracht^{141, 142}. Durch die Kombination von Antikörpern gegen TGF- β und ACE-Hemmern war es sogar möglich, auch im späten Stadium einer diabetischen Nephropathie noch ein Fortschreiten der diabetischen Nephropathie zu verhindern¹⁴³.

Um diesen möglichen Einflüssen Rechnung zu tragen, haben wir verschiedene demographische Faktoren, relevante Begleiterkrankungen, Nierenfunktion und relevante Co-Medikation in die Analyse einbezogen. Mittels einer univariaten Analyse wurde zunächst untersucht, welche Faktoren Einfluss auf die untersuchten Messparameter haben könnten. Diejenigen Faktoren, bei denen ein möglicher Einfluss auf die untersuchten Messparameter festgestellt wurde, wurden anschließend in die multiple lineare Regressionsanalyse eingeschlossen. In dieser Analyse stellte sich heraus, dass die Variablen Calcineurin-Inhibitor (CyA vs. Tacrolimus) und zweites Immunsuppressivum (MMF vs. Rapamycin) einen signifikanten Einfluss auf die TGF- β 1-Konzentration im Plasma und im Kulturüberstand haben. Einem höheren TGF- β 1-Talspiegel im Blutplasma unter Therapie mit Tacrolimus steht eine höhere TGF- β 1-Konzentration im stimulierten sowie unstimulierten Zellkulturüberstand unter CyA-Therapie gegenüber. Des Weiteren zeigte sich unter immunsuppressiver Therapie mit Rapamycin, verglichen mit MMF, ein erhöhter TGF- β 1 Talspiegel im Blutplasma sowie eine reduzierte TGF- β 1-Konzentration im stimulierten als auch unstimulierten Zellkulturüberstand. Hinsichtlich der untersuchten demographischen Faktoren fand sich lediglich zwischen Empfängeralter und TGF- β 1-Konzentration im stimulierten Kulturüberstand eine signifikante, positive Korrelation. Darüber hinaus wurden in dieser Analyse keine weiteren Faktoren mit signifikantem Einfluss auf die gemessenen Parameter entdeckt.

4.9 Korrelieren die gemessenen TGF- β 1-/ET-1-Plasmakonzentrationen mit der Transplantatfunktion oder dem Transplantatüberleben?

Zunächst wurde der Serum-Kreatinin-Verlauf über vier Jahre (2001-2004) in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass der Kreatinin-Verlauf über die Zeit in Gruppe A signifikant schlechter war als in Gruppe B. Der Vergleich zwischen Gruppe C und den beiden anderen Gruppen erbrachte keinen signifikanten Unterschied, vermutlich bedingt durch die kleine Patientenzahl in Gruppe C. Dieses Ergebnis unterstützt nicht die Hypothese, dass hohe Plasmaspiegel der profibrotischen Zytokine TGF- β 1 und ET-1 zu einem schnelleren Funktionsverlust der Transplantatniere durch eine vermehrte Fibrosierung führen. Zu bedenken ist jedoch in diesem Zusammenhang, dass das durchschnittliche "Alter des Transplantates" bei Einschluss in die Untersuchung in Gruppe A ($46,0 \pm 40,9$ Monate) signifikant höher war als in Gruppe B ($19,5 \pm 15,9$ Monate), so dass diese Aussage nur mit Einschränkungen getroffen werden kann.

In Bezug auf die histologische Sicherung einer chronischen Transplantatnephropathie ist festzustellen, dass die Häufigkeit dieser Diagnose in den drei Gruppen nicht signifikant unterschiedlich war (Gruppe A: 22,9%, Gruppe B: 10,7%, Gruppe C: 16,7%). Der histologische Nachweis einer Polyoma BK-Virus-Nephropathie erfolgte lediglich bei einem Patienten in Gruppe B (Tacrolimus + MMF), was die in der gängigen Literatur vorherrschende Meinung unterstützt, dass diese Form der Transplantatnephropathie vorwiegend bei Patienten unter einer Kombinationstherapie mit Tacrolimus und MMF auftritt¹⁴⁴.

Abschließend wurden dann alle drei Gruppen zusammengefasst, um diejenigen Patienten mit histologischem Nachweis einer chronischen Transplantatnephropathie ($n = 12$) mit den restlichen Patienten ($n = 57$) im Hinblick auf die gemessenen Parameter zu vergleichen. Zwischen diesen beiden Populationen ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die gemessenen Parameter.

4.10 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die immunsuppressive Erhaltungstherapie einen signifikanten Einfluß auf die TGF- β 1-Konzentration im Plasma und im Überstand von kultivierten Lymphozyten hat. Die Höhe der TGF- β 1-Konzentration im Plasma erlaubt jedoch keine sicheren Rückschlüsse auf die Entwicklung der Transplantatnierenfunktion. Aufgrund der Diskrepanz zwischen TGF- β 1-Plasmakonzentration und TGF- β 1-Konzentration im Kulturüberstand von Lymphozyten kann vermutet werden, dass die TGF- β 1-Konzentration im Plasma von anderen Zellen sowie von weiteren Faktoren wie z.B. demographischen Faktoren abhängig ist. Weiterhin kann festgestellt werden, dass die Lymphozytenproliferation das Ausmaß des immunsuppressiven Effektes von TGF- β 1 nicht reflektiert. Unterschiede zwischen den Gruppen im Hinblick auf die ET-1-Plasmakonzentration haben sich in der multivariaten Analyse nicht bestätigt. Aufgrund der hohen Variabilität der ET-1-Konzentration im Plasma scheint die Messung von ET-1 als prognostischem Parameter nach Nierentransplantation schwierig.

5 Literaturverzeichnis

1. Bogensberger S. Roche Lexikon Medizin. 4 ed. München
Wien Baltimore: Urban&Schwarzenberg; 1998 p. 1205.
2. Sieberth H-G. Krankheiten der Niere. In: Gerok W, Huber C, Meinertz T,
Zeidler H, editors. Die Innere Medizin. 10 ed. Stuttgart
New York: Schattauer; 2000 p. 743-792.
3. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y et al. Definition and classification of
chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease:
Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005; 67(6):2089-2100.
4. Frei U, Schober-Halstenberg H-J. Nierenersatztherapie in Deutschland.
QuaSi-Niere Jahresbericht 2004/2005. 2006. Berlin, Deutschland,
QuaSi-Niere. Ref Type: Report
5. Port FK. End-stage renal disease: magnitude of the problem, prognosis
of future trends and possible solutions. *Kidney Int Suppl* 1995; 50:3-6.
6. Merrill JP, MURRAY JE, HARRISON JH, GUILD WR. Successful
homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am
Med Assoc* 1956; 160(4):277-282.
7. Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, van der Woude FJ. Impact of renal
cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence
for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term
follow-up. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(11):2135-41.
8. Waiser J, Budde K, Schreiber M et al. The quality of life in end stage
renal disease care. *Transpl Int* 1998; 11 Suppl 1:42-5.
9. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft
survival: have we made significant progress or is it time to rethink our
analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004; 4(8):1289-
1295.
10. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current
concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81(5):643-654.
11. Waiser J, Schreiber M, Budde K et al. Age-matching in renal
transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(5):696-700.
12. Azuma H, Nadeau K, Takada M, MacKenzie HS, Tilney NL. Cellular and
molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial
ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 1997;
64(2):190-7.
13. Schindler R, Tanriver Y, Frei U. Hypertension and allograft nephropathy--
cause, consequence, or both? *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(1):8-10.

14. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int* 1998; 53(1):217-222.
15. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int* 1996; 49(2):518-524.
16. Inkinen K, Soots A, Krogerus L, Loginov R, Bruggeman C, Lautenschlager I. Cytomegalovirus enhance expression of growth factors during the development of chronic allograft nephropathy in rats. *Transpl Int* 2005; 18(6):743-749.
17. Perico N, Detcheva A, Khalil EI, Remuzzi G. Cyclosporine induces glomerulosclerosis: three-dimensional definition of the lesions in a rat model of renal transplant. *Kidney Int* 1996; 49(5):1283-1288.
18. Griffiths MH, Crowe AV, Papadaki L et al. Cyclosporin nephrotoxicity in heart and lung transplant patients. *QJM* 1996; 89(10):751-763.
19. Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 1996; 50(4):1089-1100.
20. Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickleit V, Ryffel B. The side-effects of cyclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* 1998; 49(6):356-363.
21. Furness PN. Extracellular matrix and the kidney. *J Clin Pathol* 1996; 49(5):355-9.
22. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(12):2495-508.
23. Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55(2):713-23.
24. Baboolal K, Jones GA, Janezic A, Griffiths DR, Jurewicz WA. Molecular and structural consequences of early renal allograft injury. *Kidney Int* 2002; 61(2):686-96.
25. Isoniemi HM, Krogerus L, von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Hayry P. Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts. *Kidney Int* 1992; 41(1):155-60.
26. Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res* 1981; 41(7):2842-8.
27. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;

- 78(9):5339-43.
28. Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 1994; 4(5):172-8.
 29. Lawrence DA. Transforming growth factors--an overview. *Biol Cell* 1985; 53(2):93-8.
 30. Border WA, Noble NA. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 1997; 51(5):1388-96.
 31. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7(3):363-74.
 32. Roberts AB, Heine UI, Flanders KC, Sporn MB. Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 580:225-32.
 33. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331(19):1286-92.
 34. Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 1997; 51(5):1376-82.
 35. Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 1993; 8(1):1-9.
 36. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 1998; 93(7):1159-70.
 37. Blobbe GC, Schiemann WP, Pepin MC et al. Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *J Biol Chem* 2001; 276(27):24627-24637.
 38. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(3):169-178.
 39. Blobbe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342(18):1350-1358.
 40. Fox FE, Ford HC, Douglas R, Cherian S, Nowell PC. Evidence that TGF-beta can inhibit human T-lymphocyte proliferation through paracrine and autocrine mechanisms. *Cell Immunol* 1993; 150(1):45-58.
 41. Maeda H, Shiraishi A. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol* 1996; 156(1):73-78.
 42. Lebman DA, Edmiston JS. The role of TGF-beta in growth,

- differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect* 1999; 1(15):1297-1304.
43. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 1992; 90(1):1-7.
 44. Wahl SM. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* 1994; 180(5):1587-90.
 45. Igotz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261(9):4337-45.
 46. Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 1998; 31(1 Pt 2):181-8.
 47. Pilmore HL, Yan Y, Eris JM, Hennessy A, McCaughan GW, Bishop GA. Time course of upregulation of fibrogenic growth factors and cellular infiltration in a rodent model of chronic renal allograft rejection. *Transpl Immunol* 2002; 10(4):245-54.
 48. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* 1990; 346(6282):371-4.
 49. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263(5579):663-5.
 50. Luscher TF. Endothelial control of vascular tone and growth. *Clin Exp Hypertens A* 1990; 12(5):897-902.
 51. Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 2005; 43(1):19-29.
 52. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332(6163):411-5.
 53. Rubanyi GM, Botelho LH. Endothelins. *Faseb J* 1991; 5(12):2713-20.
 54. Luscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 1992; 19(2):117-30.
 55. Cosentino F, Luscher TF. The Endocrine Endothelium. In: Becker KL, editor. *Principles and Practise of Endocrinology and Metabolism*. 3 ed. Philadelphia Baltimore New York London Buenos Aires Hong Kong Sydney Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001 p. 1634-1642.
 56. Espiner EA. Hormones of the Cardiovascular System. In: DeGroot LJ, editor. *Endocrinology*. Philadelphia London Toronto Montreal Sydney

Tokyo: W.B. Saunders Company; 1995 p. 2895-2916.

57. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994; 46(3):325-415.
58. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:851-876.
59. Ihara M, Fukuroda T, Saeki T et al. An endothelin receptor (ETA) antagonist isolated from *Streptomyces misakiensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178(1):132-137.
60. Ivy DD, Parker TA, Abman SH. Prolonged endothelin B receptor blockade causes pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(4):L758-L765.
61. Hocher B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P et al. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 1997; 99(6):1380-1389.
62. Benigni A, Zoja C, Corna D et al. A specific endothelin subtype A receptor antagonist protects against injury in renal disease progression. *Kidney Int* 1993; 44(2):440-444.
63. Orth SR, Odoni G, Amann K, Strzelczyk P, Raschack M, Ritz E. The ET(A) receptor blocker LU 135252 prevents chronic transplant nephropathy in the "Fisher to Lewis" model. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(2):387-391.
64. Braun C, Conzelmann T, Vetter S et al. Prevention of chronic renal allograft rejection in rats with an oral endothelin A receptor antagonist. *Transplantation* 1999; 68(6):739-746.
65. Klee CB, Newton DL, Ni WC, Haiech J. Regulation of the calcium signal by calmodulin. *Ciba Found Symp* 1986; 122:162-182.
66. Hama N, Paliogianni F, Fessler BJ, Boumpas DT. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II downregulates both calcineurin and protein kinase C-mediated pathways for cytokine gene transcription in human T cells. *J Exp Med* 1995; 181(3):1217-1222.
67. Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR. Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev* 1997; 11(7):824-34.
68. Lemley DE, Katz P. Therapeutic strategies in autoimmune disease: cyclosporin A as a model agent. *In Vivo* 1988; 2(1):115-118.
69. Opelz G. Collaborative Transplant Study--10-year report. *Transplant Proc* 1992; 24(6):2342-2355.

70. Halloran PF, Kung L, Noujaim J. Calcineurin and the biological effect of cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 1998; 30(5):2167-70.
71. Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation* 1999; 68(9):1356-61.
72. Einecke G, Mai I, Fritsche L et al. The value of C2 monitoring in stable renal allograft recipients on maintenance immunosuppression. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(1):215-222.
73. Nashan B, Bock A, Bosmans JL et al. Use of Neoral C monitoring: a European consensus. *Transpl Int* 2005; 18(7):768-778.
74. Einecke G, Schutz M, Mai I et al. Limitations of C2 monitoring in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(7):1463-1470.
75. Janeway AC, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie*. 5 ed. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Gustav Fischer; 2002.
76. Armstrong VW, Oellerich M. New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clin Biochem* 2001; 34(1):9-16.
77. Knoll GA, Bell RC. Tacrolimus versus cyclosporin for immunosuppression in renal transplantation: meta-analysis of randomised trials. *Bmj* 1999; 318(7191):1104-1107.
78. Hauser IA, Neumayer HN. Tacrolimus and cyclosporine efficacy in high-risk kidney transplantation. European Multicentre Tacrolimus (FK506) Renal Study Group. *Transpl Int* 1998; 11 Suppl 1:S73-S77.
79. Webster A, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(4):CD003961.
80. Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000; 59(2):323-89.
81. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc* 2004; 36(2 Suppl):25S-32S.
82. Khanna AK, Cairns VR, Becker CG, Hosenpud JD. Transforming growth factor (TGF)-beta mimics and anti-TGF-beta antibody abrogates the in vivo effects of cyclosporine: demonstration of a direct role of TGF-beta in immunosuppression and nephrotoxicity of cyclosporine. *Transplantation* 1999; 67(6):882-9.
83. Pankewycz OG, Miao L, Isaacs R et al. Increased renal tubular expression of transforming growth factor beta in human allografts

correlates with cyclosporine toxicity. *Kidney Int* 1996; 50(5):1634-1640.

84. Dell K, Bohler T, Gaedeke J, Budde K, Neumayer HH, Waiser J. Prostaglandin E(1) inhibits cyclosporine A-induced upregulation of transforming growth factor-beta 1 in rat mesangial cells. *Transplant Proc* 2001; 33(7-8):3342-3344.
85. Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Andoh TF. Pirfenidone treatment decreases transforming growth factor-beta1 and matrix proteins and ameliorates fibrosis in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Transplant* 2002; 2(2):111-9.
86. Mele TS, Halloran PF. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology* 2000; 47(2-3):215-45.
87. Nadeau KC, Azuma H, Tilney NL. Sequential cytokine expression in renal allografts in rats immunosuppressed with maintenance cyclosporine or mycophenolate mofetil. *Transplantation* 1996; 62(9):1363-6.
88. Durez P, Appelboom T, Pira C, Stordeur P, Vray B, Goldman M. Antiinflammatory properties of mycophenolate mofetil in murine endotoxemia: inhibition of TNF-alpha and upregulation of IL-10 release. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21(9):581-7.
89. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Lancet* 1995; 345(8961):1321-1325.
90. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 1995; 60(3):225-232.
91. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. *Transplantation* 1996; 61(7):1029-1037.
92. Wombolt DG, McCune TR, Stewart M. Use of mycophenolate mofetil in patients with chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 1998; 30(4):1194.
93. Ducloux D, Fournier V, Bresson-Vautrin C et al. Mycophenolate mofetil in renal transplant recipients with cyclosporine-associated nephrotoxicity: a preliminary report. *Transplantation* 1998; 65(11):1504-1506.
94. Fritsche L, Sperschneider H, Budde K et al. Late conversion to mycophenolate mofetil for chronic deterioration of renal allograft function. *Transplant Proc* 1998; 30(5):2229.

95. Fritsche L, Sperschneider H, Budde K et al. Conversion to mycophenolate mofetil for chronic progressive deterioration of renal allograft function: first clinical experiences in 44 patients. *Transplant Proc* 1998; 30(4):1190-1191.
96. Islam MS, Francos GC, Dunn SR, Burke JF, Jr. Mycophenolate mofetil and reduction in cyclosporine dosage for chronic renal allograft dysfunction. *Transplant Proc* 1998; 30(5):2230-2231.
97. Yang CW, Ahn HJ, Kim WY et al. Synergistic effects of mycophenolate mofetil and losartan in a model of chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation* 2003; 75(3):309-315.
98. Azuma H, Binder J, Heemann U, Schmid C, Tullius SG, Tilney NL. Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplantation* 1995; 59(4):460-6.
99. Badid C, Vincent M, McGregor B et al. Mycophenolate mofetil reduces myofibroblast infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. *Kidney Int* 2000; 58(1):51-61.
100. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998; 31(5):335-40.
101. Law BK, Waltner-Law ME, Entingh AJ et al. Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70s6k and down-regulation of c-myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 2000; 275(49):38261-7.
102. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tschlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 1998; 273(45):29864-72.
103. Brown EJ, Albers MW, Shin TB et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994; 369(6483):756-8.
104. Groth CG, Backman L, Morales JM et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 1999; 67(7):1036-42.
105. Kreis H, Cisterne JM, Land W et al. Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 2000; 69(7):1252-60.
106. MacDonald AS. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety

- and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001; 71(2):271-280.
107. Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000; 356(9225):194-202.
 108. Diekmann F, Campistol JM. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in chronic allograft nephropathy: benefits and risks. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(3):562-568.
 109. Diekmann F, Budde K, Oppenheimer F, Fritsche L, Neumayer HH, Campistol JM. Predictors of success in conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus in chronic allograft dysfunction. *Am J Transplant* 2004; 4(11):1869-1875.
 110. McAlister VC, Mahalati K, Peltekian KM, Fraser A, MacDonald AS. A clinical pharmacokinetic study of tacrolimus and sirolimus combination immunosuppression comparing simultaneous to separated administration. *Ther Drug Monit* 2002; 24(3):346-50.
 111. Kaplan B, Meier-Kriesche HU, Napoli KL, Kahan BD. The effects of relative timing of sirolimus and cyclosporine microemulsion formulation coadministration on the pharmacokinetics of each agent. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63(1):48-53.
 112. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2):55-63.
 113. Assoian RK, Sporn MB. Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1986; 102(4):1217-1223.
 114. Wakefield LM, Letterio JJ, Chen T et al. Transforming growth factor-beta1 circulates in normal human plasma and is unchanged in advanced metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1(1):129-36.
 115. Kropf J, Schurek JO, Wollner A, Gressner AM. Immunological measurement of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in blood; assay development and comparison. *Clin Chem* 1997; 43(10):1965-74.
 116. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8(9):871-4.
 117. Porstman T, Porstman B. Enzymimmunoassay. In: Friemel H, editor. *Immunologische Arbeitsmethoden*. Jena: Fischer; 1991 p. 135-179.
 118. Citterio F, Pozzetto U, Romagnoli J et al. Plasma levels of transforming growth factor-beta1 in renal transplant recipients receiving different

- immunosuppressive regimens. *Transplant Proc* 2004; 36(3):698-699.
119. Coupes BM, Newstead CG, Short CD, Brenchley PE. Transforming growth factor beta 1 in renal allograft recipients. *Transplantation* 1994; 57(12):1727-1731.
 120. Hetzel GR, Plum J, Ozcan F, Heering P, Grabensee B. Transforming growth factor-beta1 plasma levels in stable renal allograft recipients under different immunosuppression. *Transplantation* 2001; 71(4):586-587.
 121. Inigo P, Campistol JM, Lario S et al. Effects of losartan and amlodipine on intrarenal hemodynamics and TGF-beta(1) plasma levels in a crossover trial in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(4):822-7.
 122. Coupes BM, Williams S, Roberts IS, Short CD, Brenchley PE. Plasma transforming growth factor beta(1) and platelet activation: implications for studies in transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(2):361-7.
 123. Cohen H, Neild GH, Patel R, Mackie IJ, Machin SJ. Evidence for chronic platelet hyperaggregability and in vivo activation in cyclosporin-treated renal allograft recipients. *Thromb Res* 1988; 49(1):91-101.
 124. Pelekanou V, Trezise AE, Moore AL, Kay JE. FK 506 and rapamycin do not affect platelet aggregation or mitochondrial function. *Transplant Proc* 1991; 23(6):3200-1.
 125. Miyagi M, Muramatsu M, Ishikawa Y et al. Comparison of the therapeutic effects between CsA and FK506 on chronic renal allograft injury and TGF-beta expression. *Transplant Proc* 2002; 34(5):1589-90.
 126. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 2005; 353(8):770-781.
 127. Podder H, Stepkowski SM, Napoli KL et al. Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(5):1059-71.
 128. Khanna AK. Mechanism of the combination immunosuppressive effects of rapamycin with either cyclosporine or tacrolimus. *Transplantation* 2000; 70(4):690-4.
 129. Murphy GJ, Bicknell GR, Nicholson ML. The effect of combined rapamycin/cyclosporine on the changes in pro-fibrotic gene expression that occur during the development of allograft vasculopathy in rats, compared with cyclosporine or rapamycin in isolation. *Transpl Int* 2003; 16(5):347-53.
 130. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T et al. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular

- endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159(3):1435-40.
131. Rodriguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Lamas S. Functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1 regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression. *Circ Res* 2003; 92(12):1288-95.
 132. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 1999; 140(10):4659-68.
 133. Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277(31):27850-5.
 134. Ramzy D, Rao V, Tumiati LC et al. Role of endothelin-1 and nitric oxide bioavailability in transplant-related vascular injury: comparative effects of rapamycin and cyclosporine. *Circulation* 2006; 114(1 Suppl):I214-I219.
 135. Khanna A, Cairns V, Hosenpud JD. Tacrolimus induces increased expression of transforming growth factor-beta1 in mammalian lymphoid as well as nonlymphoid cells. *Transplantation* 1999; 67(4):614-9.
 136. Nguyen LT, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Baier M, Brownschidle C, Jacobs LD. Sex differences in in vitro pro-inflammatory cytokine production from peripheral blood of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 2003; 209(1-2):93-9.
 137. Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun* 2002; 70(5):2288-96.
 138. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 2002; 30(2):97-102.
 139. Flores L, Vidal M, Abian J et al. The effects of smoking and its cessation on 8-epi-PGF2alpha and transforming growth factor-beta 1 in Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2004; 21(3):285-9.
 140. Mezzano SA, Aros CA, Droguett A et al. Renal angiotensin II up-regulation and myofibroblast activation in human membranous nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2003;(86):39-45.
 141. Abbate M, Zoja C, Morigi M et al. Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis. *Am J Pathol* 2002; 161(6):2179-2193.

142. Kang NS, Yim HE, Bae IS et al. ACE inhibition modulates transforming growth factor-beta receptors in the young rat. *Pediatr Nephrol* 2003; 18(9):865-71.
143. Benigni A, Zoja C, Corna D et al. Add-on anti-TGF-beta antibody to ACE inhibitor arrests progressive diabetic nephropathy in the rat. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(7):1816-24.
144. Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2(1):25-30.
145. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79(10):1277-1286.

6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt. Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen, allen Kollegen und Freunden, die mir bei der Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Dissertation mit ihrem Wissen zur Seite standen, meinen Dank auszusprechen.

Ich danke sehr herzlich Herrn Prof. Dr. med. Klemens Budde für die Vergabe und Planung meiner Doktorarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Johannes Waiser für seine unentwegte Hilfestellung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Arbeiten sowie bei der Verfassung der Dissertation. Ohne seine konsequente Unterstützung wäre diese Dissertation in der hier vorliegenden Form nicht möglich gewesen.

Für die Unterstützung sowohl in der Planung als auch in der Durchführung danke ich ebenfalls sehr herzlich Herrn Dr. rer. medic., Dipl. Biol. Torsten Böhler sowie Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Hans-H. Neumayer.

Die großzügige Bereitstellung der histologischen Abbildungen verdanke ich Frau Dr. med. Birgit Rudolph.

Den Mitarbeitern der Klinik und insbesondere Frau Pia Hambach möchte ich ebenfalls für die anhaltende Unterstützung bei der Bewältigung der zahlreichen kleinen und großen Probleme im Laboralltag, welche mit einer Dissertation verbunden sind, danken.

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

8 Erklärung

„Ich, Michael Schneider, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Expression profibrotischer Zytokine und Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit von der immunsuppressiven Erhaltungstherapie nach Nierentransplantation“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

01.11.2007

Datum

Schneider

Unterschrift