

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

DISSERTATION

Prospektive Untersuchung der T-Zellpopulationen von
nierentransplantierten Patienten bei später Umstellung auf
Belatacept

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Julie Künzel
aus Berlin

Datum der Promotion: 04.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Zusammenfassung	V
Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die Nierentransplantation	1
1.2 Die Geschichte der Organtransplantation	2
1.3 Das Immunsystem	4
1.3.1 Spezifisches / Unspezifisches Immunsystem	4
1.3.2 T- und B-Zell-Aktivierung	4
1.3.3 T-Zell Ko-Stimulation und Ko-Inhibition	6
1.3.4 T-Zell-Subpopulationen	8
1.3.4.1 Th1-/Th2-Zellen	10
1.3.4.2 Th17-Zellen	10
1.3.4.3 Regulatorische T-Zellen	11
1.3.4.4 Th17-/Treg-Interaktion	12
1.4 Transplantationsimmunologie	15
1.4.1 Faktoren einer erfolgreichen Transplantation: HLA-Matching	15
1.4.2 Abstoßungsreaktionen	16
1.4.2.1 Identifizierung von Alloantigenen durch T-Zellen	16
1.4.2.2 Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen	16
1.4.2.3 Molekulare Mechanismen der Transplantatabstoßung	17
1.4.2.4 Histopathologie der Transplantatabstoßung - Banff-Klassifikation	18
1.4.3 Immunsuppression bei Nierentransplantation	20
1.4.3.1 Standard-Immunsuppressiva	20
1.4.3.2 Glucocorticoide	20
1.4.3.3 Calcineurininhibitoren	21
1.4.3.4 Antimetabolite	22
1.4.3.5 mTOR-Inhibitoren	23
1.4.3.6 Belatacept	24
1.5 Ziel der Studie	27

2	Material und Methoden	28
2.1	Studienaufbau	28
2.1.1	Studienablauf und -medikation	28
2.1.2	Patientenpopulation	29
2.2	Materialien.....	30
2.2.1	Probenmaterial	30
2.2.2	Labormaterial.....	30
2.3	Methoden	32
2.3.1	Fluoreszenz Durchflusszytometrie	32
2.3.1.1	Methode und Prinzip	32
2.3.1.2	Durchführung	34
2.3.2	ELISA	41
2.3.2.1	Methode und Prinzip	41
2.3.2.2	Durchführung	41
2.3.3	Klinische Parameter.....	42
2.3.4	Datenverwaltung und statistische Auswertung.....	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Charakterisierung der Probanden.....	44
3.2	Patienten- und Transplantatüberleben.....	47
3.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der T-Zellsubpopulationen.....	48
3.3.1	CD3+ Lymphozyten	48
3.3.2	CD3+CD4+ T-Zellen	48
3.3.2.1	CD4+ Subpopulationen	49
3.3.2.2	Aktivierte CD4+ Zellen.....	50
3.3.2.3	T-Helferzellen 1 (Th1)	51
3.3.2.4	T-Helferzellen 2 (Th2)	52
3.3.2.5	Th1/Th2 Ratio	52
3.3.2.6	Th17 Zellen	53
3.3.2.7	Regulatorische T-Zellen (Treg).....	54
3.3.2.8	Aktivierte Tregs	57
3.3.2.9	Th17/Treg Ratio	57
3.3.3	CD3+CD8+ T-Zellen	58
3.3.3.1	CD8+ Subpopulationen	58
3.3.3.2	Aktivierte CD8+ Zellen.....	60
3.3.3.3	CD4/CD8 Ratio	61

3.4	Interleukin-17-Konzentration im peripheren Blut.....	61
3.4.1	ELISA IL-17A.....	61
3.5	Klinische Parameter	63
3.5.1	Glomeruläre Filtrationsrate	63
3.5.2	Albumin-Kreatinin-Quotient.....	64
4	Diskussion	66
4.1	Einfluss der Ko-Stimulationsblockade auf die peripheren T-Lymphozyten.....	66
4.1.1	CD3+CD4+ Subpopulationen	66
4.1.2	Th1/Th2 Zellen	68
4.1.3	Th17+ Zellen	69
4.1.4	IL-17A.....	72
4.1.5	Treg- Zellen	74
4.1.6	Th17/Treg Ratio.....	75
4.1.7	CD3+CD8+ Subpopulationen	76
4.2	Einfluss der Ko-Stimulationsblockade auf die klinischen Parameter	78
4.3	Stärken und Limitationen der Studie.....	79
	Literaturverzeichnis	82
	Eidesstattliche Versicherung	96
	Lebenslauf	97
	Danksagung	98

Abkürzungsverzeichnis

ABMR	Antibody mediated rejection
ADPKD	Autosomal Dominante Polyzystische Nierenerkrankung
Ag	Antigen
aHUS	atypisches Hämolytisch-Urämisches Syndrom
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
aTreg	Aktivierte Treg
AZA	Azathioprin
BENEFIT	Belatacept Evaluation of Nephroprotection and Efficacy as First-line Immunosuppression Trial
BENEFIT-EXT	BENEFIT-EXTended criteria donors
BL	Baseline
CCR	C-C Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CKD-EPI	Chronic-Kidney-Disease-Epidemiology-Collaboration
CNI	Calcineurininhibitor
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTLA-4-Ig	CTLA-4-Immunglobulin
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
Cy	Cyanin
CyA	Cyclosporin A
DZ	Dendritische Zelle
EBV	Epstein-Barr-Virus
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FKBP	FK506-binding protein
FMO	Fluorescence minus one
FoxP3	Forkhead box protein 3
FSC	Forward scatter
GATA-3	GATA binding protein 3
GC	Glucocorticoide
GI	Gastrointestinal
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IF	Interstitielle Fibrose
IFN- γ	Interferon- γ
IgG1	Immunglobulin G Typ 1
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphatdehydrogenase

IQR.....	Interquartil-Range
KDIGO.....	Kidney disease: Improving Global Outcomes
MAP	Mitogen-activated protein
MHC	Major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolatmofetil
MPA	Mycophenolsäure
mTOR.....	Mammalian target of rapamycin
mTORi.....	mTOR-Inhibitor
NF-ATc.....	Nuclear factor of activated T-cells
NTx.....	Nierentransplantation
PAMP`s	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC.....	Peripheral blood mononuclear cells
PCR.....	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP.....	Peridinin-Chlorophyll
PRA.....	Panel reactive antibodies
PRRs.....	Pattern recognition receptors
PTLD.....	Posttransplant lymphoproliferative disorder
RA	Rheumatoide Arthritis
RORyt	Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t
SSC.....	Side scatter
STAT3.....	Signal transducer and activator of transcription 3
TA.....	Tubulus-Atrophie
Tac	Tacrolimus
T-bet.....	T-Box-Transkriptionsfaktor
TCMR.....	T-cell mediated rejection
Tc-Zellen	Zytotoxische T-Zelle
TEMRA.....	Effector memory cells re-expressing CD45RA
TGF-β.....	Transforming growth factor beta
Th1	Typ 1 CD4+ Helferzelle
Th2.....	Typ 2 CD4+ Helferzelle
TNF-α.....	Tumornekrosefaktor-α
Treg.....	T-regulatorischen-Zellen
Tx	Transplantation
TZR.....	T-Zell Rezeptor
V450.....	Violet 450nm

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Ko-Stimulation der T-Zelle	7
Abb. 2	Effekt fehlender CD28-Ko-Stimulation auf die Qualität und Expansion von T-Zellen	9
Abb. 3	Th17-/Treg-Entwicklung und -Interaktion	14
Abb. 4	Ko-Stimulationsblockade durch Belatacept	25
Abb. 5	Schema zur Umstellung von CNI / mTORi auf Belatacept	28
Abb. 6	Übersicht über die Einteilung der T-Zellen mit Hilfe von Biomarkern	37
Abb. 7	Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellfärbung	38
Abb. 8	Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse der Th17/Th1/Th2-Zellfärbung	39
Abb. 9	Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse der Treg-Zellfärbung	40
Abb. 10	Schematischer Aufbau ELISA	41
Abb. 11	7-Jahres-Patienten- und Transplantatüberleben	47
Abb. 12	Analyse der CD3+CD4+ Subpopulationen	50
Abb. 13	Analyse der Th1-Zellen	51
Abb. 14	Analyse der Th2-Zellen	52
Abb. 15	Analyse der Th17-Zellen	54
Abb. 16	Analyse der T-regulatorischen Zellen	56
Abb. 17	Analyse der CD8+ T-Zellen	58
Abb. 18	Analyse der aktivierten CD8+ T-Zellen	60
Abb. 19	Analyse der eGFR	63
Abb. 20	Analyse der Albuminurie	65

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Banff-Klassifikation	19
Tab. 2	Tabellarische Darstellung der Umstellung auf Belatacept inkl. Dosierungen	29
Tab. 3	Gruppeneinteilung der Studienpatienten	30
Tab. 4	Laborgeräte	30
Tab. 5	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	31
Tab. 6	Software	31
Tab. 7	Antikörper	32
Tab. 8a	Antikörper- Färbung T-Zellen	35
Tab. 8b	Antikörper- Färbung Th17/Th1/Th2	35
Tab. 8c	Antikörper- Färbung Treg (T-regulatorische Zellen)	35
Tab. 9	Charakterisierung der Studien- und Kontrollpatienten	45
Tab. 10	Grunderkrankungen der Studien- und Kontrollpatienten	45
Tab. 11	Immunsuppressive Zusatzmedikation der Studien- und Kontrollpatienten	46
Tab. 12	CD3+ T-Lymphozyten	48
Tab. 13	CD3+CD4+ T-Helferzellen	49
Tab. 14	Aktivierte CD4+ T-Zellen	51
Tab. 15	Th1/Th2 Ratio	52
Tab. 16	Th17-Zellen der Gruppe Belatacept 1	53
Tab. 17	Th17-Zellen der Gruppe Belatacept 2	53
Tab. 18	Treg-Zellen der Gruppe Belatacept 1	55
Tab. 19	Treg-Zellen der Gruppe Belatacept 2	55
Tab. 20	Aktivierte Treg-Zellen	57
Tab. 21	Th17/Treg Ratio	57
Tab. 22	CD3+CD8+ T-Zellsubpopulationen. Vergleich innerhalb der Studiengruppen zwischen Baseline und Monat 12	59
Tab. 23	CD3+CD8+T-Zellsubpopulationen. Vergleich zwischen Studiengruppen und Kontrollgruppen im Monat 12	59
Tab. 24	CD4/CD8 Ratio	61
Tab. 25	IL-17A Konzentration im Plasma der Studiengruppe B1 und Kontrollgruppe K1	62
Tab. 26	IL-17A Konzentration im Plasma der Studiengruppe B2 und Kontrollgruppe K2	62
Tab. 27	Berechnete glomeruläre Filtrationsrate - eGFR	64
Tab. 28	Albumin-Kreatinin Quotient	65

Zusammenfassung

Prospektive Untersuchung der T-Zellpopulationen von nierentransplantierten Patienten bei später Umstellung auf Belatacept

Hintergrund: Belatacept ist ein Immunsuppressivum, welches zur Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation (NTx) eingesetzt wird. Es handelt sich um einen CD28-Ko-Stimulationshemmer, der die T-Zell-Aktivierung und Proliferation hemmt und im Gegensatz zu den Calcineurin-Inhibitoren (CNI) Cyclosporin A und Tacrolimus nicht nephrotoxisch wirkt. Daher wird Belatacept auch als Rescue-Therapie bei Patienten mit CNI-Nephrotoxizität eingesetzt. Derzeit ist nicht bekannt, ob es bei Umstellung auf Belatacept zu Änderungen in der Zusammensetzung der peripheren T-Zell-Populationen kommt.

Methoden: Ziel dieser Studie war es, die Entwicklung der peripheren T-Zell-Populationen und der Nierenfunktion bei später Konversion nierentransplantierte Patienten auf Belatacept zu untersuchen. Zu diesem Zweck führten wir über 12 Monate (M) durchflusszytometrische Analysen (FACS) des peripheren Blutes bei 19 NTx-Patienten durch, die aufgrund von Arzneimittelnebenwirkungen von einem Calcineurin-Inhibitor (CNI) (B1, n=10) oder mTOR-Inhibitor (B2, n=9) auf Belatacept umgestellt wurden. Als Kontrolle dienten vergleichbare Patienten unter unveränderter Erhaltungsimmunosuppression (CNI n=10; mTORi n=9). Zusätzlich wurden die glomeruläre Filtrationsrate (eGFR), Albuminurie und die IL-17A Konzentration im Plasma (ELISA-Sandwichttechnik) gemessen.

Ergebnisse: In Gruppe B1 zeigte sich nach 6 Monaten eine Reduktion der pro-inflammatorischen Th17-Zellen (Baseline (BL) vs. M6: 67/ μ l (41-113) vs. 47/ μ l (25-96), p=0,031) ohne korrespondierende Abnahme des von ihnen produzierten IL-17A (2,8 pg/ml (2,2-6,1) vs. 2,8 pg/ml (2,0-6,5), p=0,547). Parallel kam es zu einer Reduktion der regulatorischen T-Zellen in beiden Gruppen (B1: BL vs. M9: 30/ μ l (18-42) vs. 18/ μ l (11-25), p=0,004; B2: BL vs. M9: 23/ μ l (20-42) vs. 15/ μ l (12-31), p=0,039). Bei der Th17/Treg-Ratio kam es zu keiner signifikanten Änderung im Verlauf. In Gruppe B2 kam es nach 12 Monaten außerdem zu einer Verringerung der Th1-Zellen (BL vs. M12: 50/ μ l (20-58) vs. 29/ μ l (15-31); p=0,039). Bezüglich der Nierenfunktion zeigte sich ein Jahr nach

Konversion in Gruppe B1 eine Verbesserung der eGFR um 8 ml/min ($p=0,002$). Während des 12-monatigen Studienzeitraumes traten keine Todesfälle, Abstoßungsreaktionen oder Transplantatverluste auf.

Schlussfolgerung: Belatacept kann zur späten Konversion von Patienten mit unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen unter CNI- oder mTORi-Therapie eingesetzt werden. Besonders NTx-Patienten unter CNI-Therapie können von einer Konversion auf Belatacept profitieren: zum einen aufgrund der einer Verbesserung der Nierenfunktion, zum anderen durch eine Reduktion der zirkulierenden pro-inflammatorischen T-Zellen. Bei Patienten, die von mTORi umgestellt wurden, zeigten sich keine Nachteile in Bezug auf die Nierenfunktion und das Profil der peripheren T-Zell-Populationen. Basierend auf diesen Daten ist Belatacept funktionell und immunologisch gegenüber mTORi zumindest als "non inferior" einzuordnen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um insbesondere den Effekt der CD28-unabhängigen T-Zellaktivierung besser verstehen und in Zukunft verhindern zu können.

Abstract

A prospective analysis of T-cell populations in kidney transplant patients following late conversion to belatacept

Background: Belatacept is an immunosuppressive drug, used to prevent graft rejection after renal transplantation. As a CD28 co-stimulation inhibitor, Belatacept inhibits T-cell activation and proliferation without nephrotoxic side effects, such as calcineurin inhibitors (CNI). Among others, belatacept is currently used as a rescue therapy in patients with CNI nephrotoxicity. To date, it is unclear, whether conversion to Belatacept results in changes of the composition of peripheral T-cell populations.

Methods: In this study, we investigated peripheral T-cell populations and renal function in kidney-transplant patients, who underwent late conversion to belatacept. We performed flow cytometric analyses (FACS) of peripheral blood cells during 12 months (M) after conversion in 19 renal transplant patients, converted to belatacept from a calcineurin inhibitor (CNI) (B1, n=10) or mTOR inhibitor (B2, n=9) due to drug side effects. Comparable patients on unchanged maintenance immunosuppression (CNI n=10; mTORi n=9) served as controls. Additionally, eGFR, albuminuria and plasma IL-17A concentration (ELISA sandwich assay) were assessed.

Results: In group B1 we found a reduction of proinflammatory Th17 cells at 6 months after conversion (baseline (BL) vs. M6: 67/ μ l (41-113) vs. 47/ μ l (25-96), $p=0.031$) without a corresponding decrease in the IL-17A levels (2.8 pg/ml (2.2-6.1) vs. 2.8 pg/ml (2.0-6.5), $p=0.547$). There was also a reduction of regulatory T cells (Treg) in both groups (B1: BL vs. M9: 30/ μ l (18-42) vs. 18/ μ l (11-25), $p=0.004$; B2: BL vs. M9: 23/ μ l (20-42) vs. 15/ μ l (12-31), $p=0.039$). We found no significant change in the Th17/Treg ratio during the one-year course. Group B2 also experienced a decrease of Th1 cells after 12 months (BL vs. M12: 50/ μ l (20-58) vs. 29/ μ l (15-31); $p=0.039$). In group B1 eGFR improved at 12 months after conversion by 8 ml/min ($p=0.002$). During the one-year study period no deaths, rejection or graft losses occurred.

Conclusion: Belatacept is applicable for the late conversion of patients with adverse drug reactions under CNI or mTOR inhibitor therapy. Especially, renal transplant patients

under CNI-based immunosuppression may benefit from late conversion to belatacept with an improvement of renal function and a reduction of circulating proinflammatory T-cells. In patients, who were converted from mTOR inhibitors, we observed no disadvantages in terms of renal function and the profile of peripheral T-cell populations. Based on these data, belatacept can be classified at least as "non inferior" compared to mTOR inhibitors. Further investigations are necessary to better understand and prevent especially CD28-independent T-cell activation clinically and immunologically in the future.

1 Einleitung

1.1 Die Nierentransplantation

Die Diagnose terminale Niereninsuffizienz ist für die betroffenen Patienten ein schwerwiegender Einschnitt. Um zu überleben, müssen sie sich entweder lebenslang der chronischen Dialysebehandlung unterziehen, oder eine Spenderniere transplantieren lassen.

Die Nierentransplantation ist weltweit der am häufigsten durchgeführte Organersatz mit einem Fremdorgan. Von 1963 bis 2019 wurden bundesweit 88.733 Nieren verpflanzt¹. Nierenersatzverfahren wie die Hämodialyse und die Peritonealdialyse sind mit einer höheren Mortalität² sowie einer schlechteren Lebensqualität^{3,4} im Vergleich zur Nierentransplantation assoziiert. Außerdem bedeuten sie für die Patienten und die betreuenden Ärzte einen deutlich höheren Zeitaufwand. Nicht zuletzt sind die Behandlungskosten auch heute nach einer erfolgreichen Nierentransplantation niedriger⁵. Dementsprechend stellt die Nierentransplantation die Therapie der Wahl dar.

Nach dem deutschen Transplantationsgesetz sind alle Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz für die Aufnahme auf die Warteliste zur Nierentransplantation berechtigt, wobei die individuelle Gesundheitssituation, etwaige Kontraindikationen und die Aussicht auf einen langfristigen Transplantationserfolg mitberücksichtigt werden müssen⁶. Leider hat nur die Minderheit der dialysepflichtigen Patienten die Möglichkeit, über Verwandte, Freunde oder die Eurotransplant-Warteliste ein Spenderorgan zu erhalten. Im Jahr 2019 standen auf der Eurotransplant-Warteliste ca. 7000 Patienten aus Deutschland, die "aktiv" auf eine Spenderniere warteten¹. Im gleichen Jahr erhielten davon allerdings nur 30% der Patienten, die auf der aktiven Warteliste standen, eine Spenderniere¹. Bei gleichbleibendem Bedarf an Spenderorganen entwickelte sich die Anzahl der Organspender bis 2017 bundesweit rückläufig⁷. Das heißt, mehr Patienten warten länger auf eine Spenderniere und ihr gesundheitlicher Zustand verschlechtert sich mit zunehmender Wartezeit. Die Patienten sind dadurch gezwungen auf Lebendnierenspenden zu hoffen oder müssen Spenderorgane mit erweiterten Spenderkriterien bzw. immunologischen Kriterien akzeptieren.

Obwohl sich die medizinische Technik inklusive Diagnostik und die zur Verfügung stehenden Pharmazeutika stetig weiterentwickeln, gibt es nach wie vor viele Hürden in Bezug auf den langfristigen Erhalt der Funktion von Spendernieren. Abstoßungsreaktionen gegen das Spenderorgan und die Nephrotoxizität von Immunsuppressiva sind häufige Ursachen für einen vorzeitigen Transplantatverlust, die durch neue

Pharmazeutika vermindert werden sollen. Deswegen ist für transplantierte Patienten die Erforschung und Entwicklung neuer Immunsuppressiva essentiell.

Das bereits erwähnte Missverhältnis zwischen benötigten und transplantierten Organen weist auf die besondere Verantwortung der Wissenschaft hin, die übertragenen Nieren mit den wirksamsten verfügbaren Medikamenten so lange wie möglich mit geringen Nebenwirkungen zu erhalten.

1.2 Die Geschichte der Organtransplantation

Die Grundlage für die heute möglichen Organtransplantationen wurde schon um 1900 gelegt. Zur damaligen Zeit war das Nierenversagen ein sicheres Todesurteil. Der österreichisch-ungarische Chirurg Emerich Ullmann war ein Pionier auf dem Gebiet der Nierentransplantation⁸. Ullmann war der Erste, der Homo- und Heterotransplantationen von Nieren an Tieren durchführte und 1902 versuchte, eine Xenotransplantation mit einer Schweineniere durchzuführen, die er in die Ellenbeuge einer Frau mit Nierenerkrankung im Endstadium anastomosierte⁹. Diese frühen Versuche einer Nierentransplantation waren leider nicht von Erfolg gekrönt, stellten aber die Weichen für die weitere Entwicklung der Transplantationschirurgie. Damals wie heute war und ist die Verfügbarkeit von Spenderorganen die Hauptlimitation für ein erfolgreiches Transplantationsprogramm. Nachdem Tierorgane als Therapieoption ausgeschlossen und Versuche mit menschlichen Nieren durchgeführt wurden, erkannte man, dass die Ischämiezeit einen wichtigen Einfluss auf das Transplantatüberleben hat. Daraufhin wurden erste Nierentransplantationen mit Organen von Lebend Spendern durchgeführt¹⁰. Sir Peter Medawar war während des 2. Weltkrieges ein Meilenstein bei der Erforschung der Akzeptanz und Abstoßung von Transplantaten gelungen. Er zeigte, dass Hauttransplantate von nahen Familienmitgliedern besser und länger vom Empfänger akzeptiert wurden, als Transplantate von nichtverwandten Spendern. In weiteren Versuchen konnte er zeigen, dass eine zweite Hautspende vom gleichen Spender eine schnellere und heftigere Abstoßungsreaktion hervorruft, als bei der ersten Transplantation¹¹. Damit war der Grundstein für die Transplantationsimmunologie gelegt. Es wurde klar, dass die zweite Abstoßungsreaktion offensichtlich durch ein immunologisches Gedächtnis gesteuert wurde und dadurch schneller und spezifischer ablaufen konnte.

Joseph Murray gelang 1954 die erste erfolgreiche Transplantation einer Niere zwischen eineiigen Zwillingen¹², was belegte, dass genetisch identische Individuen die gleichen

Gewebsantigene besitzen und gegenseitige Organtransplantationen ohne Abstoßungsreaktion möglich sind. Um diese Operation auch an genetisch unterschiedlichen Personen durchführen zu können, musste die Immunantwort des Empfängers unterdrückt werden. Dies gelang zunächst durch massive Röntgenbestrahlung und später durch den Einsatz der neu entdeckten Medikamente Azathioprin und Prednison 1959¹³. In Deutschland erfolgte die erste erfolgreiche Nierentransplantation 1963 durch Wilhelm Brosig und Reinhard Nagel am Klinikum Steglitz in Berlin^{8,14}. Die Transplantationsimmunologie wurde durch die Erstbeschreibung der Leukozytenantigene von Dausset 1958¹⁵ als Basis für die Gewebstypisierung bei der Empfänger- und Spenderauswahl revolutioniert. Die Entwicklung von immunsuppressiven Pharmazeutika wie Cyclosporin 1978¹⁶ und Tacrolimus 1990¹⁷, welche bis heute standardmäßig eingesetzt werden, waren weitere Meilensteine in der Transplantationsmedizin. Von hier an gab es eine stetige Weiterentwicklung auf technischer, pharmakologischer und diagnostischer Ebene. Aufgrund all dieser Entwicklungen liegt heute in Deutschland das 3-Jahres-Transplantatüberleben nach Nierentransplantation über 90%¹⁸.

1.3 Das Immunsystem

1.3.1 Spezifisches / Unspezifisches Immunsystem

Bei der Immunabwehr unterscheidet man die angeborene antigenunspezifische von der adaptiven antigenspezifischen Abwehr. Die angeborene Immunantwort besteht aus mechanischen Barrieren und humoralen Bestandteilen, wie z.B. den Interleukinen (IL), sowie zellulären Bestandteilen, die unspezifisch körperfremde oder schädliche Zellen erkennen und bekämpfen. Zu den Zellen der unspezifischen Immunantwort gehören u.a. natürliche Killerzellen, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen (DZ). Sie können körperfremde Zellen sowie Erreger zerstören, und Antigene dieser Zellen den Abwehrzellen der spezifischen Immunabwehr präsentieren. Beide Abwehrsysteme arbeiten zusammen, indem die unspezifische Abwehr schnell und antigenunabhängig stark konservierte Strukturen von Pathogenen, sog. "Pathogen-Associated Molecular Patterns" (PAMPs), durch "Pattern Recognition Receptors" (PRRs) erkennt und dadurch die spezifische Immunantwort in Form der Lymphozyten-Aktivierung einleitet. Bei der spezifischen Immunantwort können zwei Haupttypen von Lymphozyten unterschieden werden: B-Lymphozyten (= B-Zellen), die im Knochenmark, und T-Lymphozyten (= T-Zellen), die im Thymus reifen.

1.3.2 T- und B-Zell-Aktivierung

Die Aktivierung von T- und B-Zellen über die Bindung von spezifischen Alloantigenen erfolgt auf verschiedenen Wegen. T-Zellen sind in der Lage, über ihren T-Zell-Rezeptor Peptide zu erkennen, die in einer anderen Zelle durch den Abbau von Proteinen entstehen und dann auf deren Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Peptide müssen an ein spezielles Membranglykoprotein gebunden sein, das MHC-Molekül, welches durch ein Cluster von Genen codiert wird das man als Major Histocompatibility Complex (MHC) bezeichnet. Es werden zwei Klassen von MHC-Molekülen unterschieden: MHC-Klasse-1-Moleküle, welche auf allen kernhaltigen Zellen und MHC-Klasse-2-Moleküle, welche auf Antigen präsentierenden Zellen (APZs) exprimiert werden können¹⁹. Aufgabe der MHC-Klasse-1 Proteine ist die Antigenpräsentation für zytotoxische T-Zellen. Diese T-Zelle bindet spezifisch an den Komplex aus Antigen und MHC-Klasse-1-Molekül auf der Zielzelle und zerstört diese durch die Freisetzung von Perforin und Granzymen ("zelluläre" Immunreaktion). Die Präsentation von Antigenen auf APZs durch ein MHC-Klasse-2-Molekül dagegen veranlasst die Bindung von T-Helferzellen und in der Folge u.a. die Aktivierung von B-Lymphozyten ("humorale" Immunreaktion).

Im Rahmen einer Abstoßungsreaktion werden humane Leukozyten Antigene (HLA; humanes Synonym für MHC) des Spenders vom Immunsystem des Empfängers erkannt. Dies führt zu einer Immunreaktion. Beim "indirekten" Aktivierungsweg werden MHC-Alloantigene des Spenders von APZs des Empfängers intrazellulär verarbeitet und die MHC-Alloantigen-Komplexe den T-Zellen des Empfängers präsentiert. Bei der "direkten" Aktivierung erkennen T-Zellen des Empfängers intakte MHC-Alloantigene auf der Oberfläche von Spenderzellen.

Zur Aktivierung der spezifischen Immunantwort ist eine Wechselwirkung der T-/B-Zelle sowohl mit dem spezifischen Antigen als auch mit kostimulierenden Molekülen anderer Zellen nötig. Naive T-Zellen werden mit Hilfe von APZs aktiviert, naive B-Zellen mit Hilfe von T-Lymphozyten. Neben dendritischen Zellen können auch Makrophagen und B-Zellen Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren und kostimulierende Moleküle exprimieren, um naive T-Zellen zu aktivieren. Zusätzlich spielen Zytokine bei der Aktivierung eine wichtige Rolle. Interleukine sind Zytokine, die zwischen Leukozyten Signale austauschen. Es gibt über 40 verschiedene Interleukine, welche die Kommunikation zwischen Immunzellen modulieren. Daneben haben Interleukine auch vielfältige weitere Effekte auf unterschiedliche Gewebe und Zellen.

Die Antigenpräsentation an naive T-Zellen findet im lymphatischen Gewebe statt. Entweder werden die Erreger über die Lymphbahnen zu den Lymphknoten bzw. über die Blutbahn zur Milz transportiert oder APZs nehmen das Pathogen am Infektionsort auf und wandern anschließend ins lymphatische Gewebe. Dort präsentieren aktivierte APZs den naiven T-Zellen verarbeitete Antigenfragmente auf den entsprechenden MHC-Molekülen. Nach Aktivierung der T-Zellen werden abhängig von den jeweiligen Ko-Stimulationsreizen unterschiedliche Abwehrmechanismen initiiert. Zum einen können B-Zellen aktiviert werden, die sich daraufhin zu Plasmazellen ausdifferenzieren, welche Antikörper gegen das spezifische Antigen produzieren. Zum anderen kann aber auch die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen begünstigt werden, welche Zellen zerstören, die ein spezifisches Antigen exprimieren. Letztendlich führen diese Prozesse synergistisch zu einer antigenspezifischen Immunreaktion, die im Falle einer allogenen Organtransplantation spezifisch gegen das Spenderorgan gerichtet ist und im immunologischen Gedächtnis des Empfängers gespeichert bleibt.

1.3.3 T-Zell Ko-Stimulation und Ko-Inhibition

Die Aktivierung einer naiven T-Zelle erfordert neben der Antigen (Ag)-Präsentation ein zweites Signal (Ko-Stimulus)¹⁹. Bei dem ersten Signal handelt es sich, wie zuvor beschrieben, um die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor (TZR) und Ag-MHC-Komplex auf der APZ. Das zweite positive Signal erreicht die T-Zelle über einen oder mehrere Oberflächenrezeptoren, die ihre spezifischen Liganden auf APZs binden und so zur T-Zell-Aktivierung beitragen. Das alleinige TZR-Ag/MHC-Signal ohne positive Ko-Stimulation kann die T-Zelle in einen Zustand der klonalen Anergie versetzen.

Der wichtigste Rezeptor auf der T-Zelle für die Ko-Stimulation ist CD28 (CD: Cluster of differentiation), ein Transmembranprotein, welches auf etwa 80% der CD4+ T-Zellen und 50% der CD8+ T-Zellen im Menschen exprimiert wird²⁰. CD28 geht im Rahmen der Ko-Stimulation eine Bindung mit seinen Liganden CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2) auf der APZ ein²¹. Neben der CD28-vermittelten Ko-Stimulation existieren weitere Ko-Stimulationswege, wie an CD28-defizienten Mäusen gezeigt wurde²². Letztendlich modulieren stimulierende und hemmende Ko-Signale die Immunantwort nicht nur über die Aktivierung naiver T-Zellen, sondern auch über die Steuerung der Funktion von geprägten, Antigen-erfahrenen Zellen²³. Die Expression von CD80 auf APZs ist induzierbar, CD86 wird dagegen konstitutiv exprimiert, kann aber durch Entzündungsvorgänge vermehrt exprimiert werden. CD86 spielt dementsprechend bei der frühen Ko-Stimulation eine wichtige Rolle, während CD80 die T-Zell Antwort eher moduliert, als sie zu initiieren.

Der Gegenspieler von CD28 ist das cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), ein Protein, welches auf aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen exprimiert wird und eine 20x höhere Affinität für die B7-Liganden aufweist als CD28. CTLA-4 bewirkt, sobald es von der aktivierten Zelle exprimiert wird, eine effektive lokale Hemmung der CD28-vermittelten T-Zell-Aktivierung und so eine "Abbremsen" der Immunantwort²⁴. Neben der inhibitorischen Funktion hat CTLA-4 auch intrinsische Effekte. CTLA-4 ist ein endozytischer Rezeptor, der nach seiner Bindung an die B7-Moleküle CD80/CD86 auf APZs zum Abbau dieser Liganden in der T-Zelle durch Trans-Endozytose führt. Hierdurch wird die Ko-Stimulationsfähigkeit der APZ-Zellen reduziert und die T-Zellaktivierung weiter supprimiert²⁵.

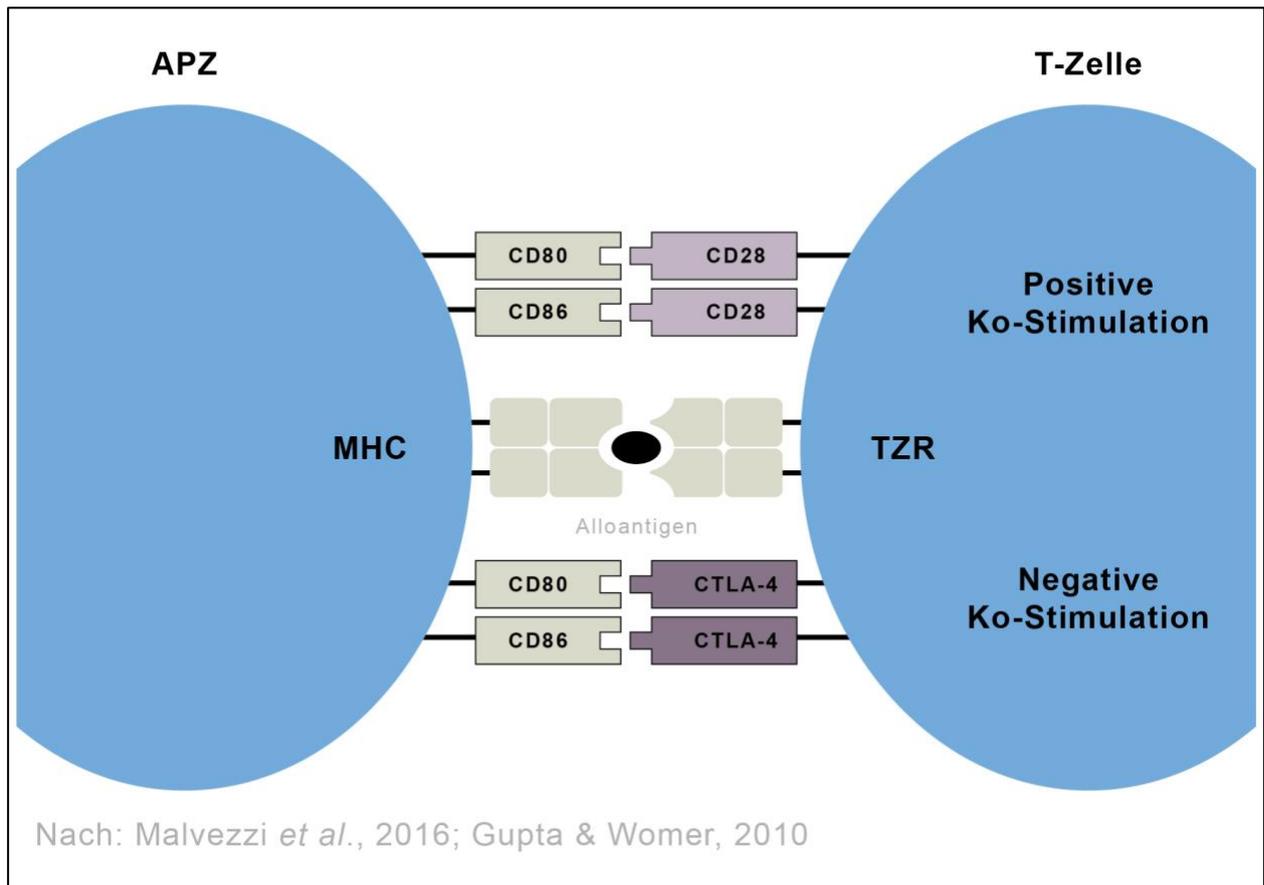


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Ko-Stimulation der T-Zelle. Die Abbildung zeigt die Aktivierung der T-Zelle über den Major Histocompatibility Complex (MHC) der Antigen präsentierenden Zelle (APZ) mit dem gekoppelten Alloantigen an den T-Zell-Rezeptor (TZR) sowie die positive Ko-Stimulation über CD80/86 - CD28 sowie die negative Ko-Stimulation über CD80/86 - CTLA-4. Adaptiert nach^{26,27}.

1.3.4 T-Zell-Subpopulationen

T-Lymphozyten entwickeln sich wie B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen aus einer lymphatischen Vorläuferzelle und können in funktionelle Untergruppen unterteilt werden. Diese Zellen besitzen bestimmte Oberflächenmoleküle, die über monoklonale Antikörper identifiziert und damit bestimmten Zelllinien zugeordnet werden können. Die Klassifikation dieser Oberflächenmoleküle erfolgt anhand des sogenannten "Cluster of Differentiation" (CD)²⁸. Allen T-Lymphozyten gemein ist der T-Zell-Rezeptor-Komplex TZR-CD3, welcher sich, wie zuvor erläutert, als erstes Aktivierungs-Signal mit dem Antigen-MHC-Komplex verbindet²⁹. Demzufolge lassen sich die Zellen, die das CD3-Molekül tragen, als T-Zellen identifizieren. Die weitere Unterteilung der T-Zellen erfolgt über ihre Ko-Rezeptoren für den MHC. CD4-Moleküle dienen als Ko-Rezeptoren für MHC-Klasse-2-Moleküle, CD8-Moleküle dagegen als Ko-Rezeptoren für MHC-Klasse-1-Moleküle. Anhand dieser Oberflächenmoleküle kann man die T-Zellen dementsprechend in CD4+ (CD4 positive) T-Helferzellen und CD8+ T-Zellen unterscheiden³⁰. Mit Hilfe der Aktivierungs- und Identifikationsmarker CD194 (CCR7) und CD45RA können diese beiden Hauptgruppen in 4 Subgruppen unterteilt werden. Dabei werden T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, als "naive" Zellen bezeichnet, sobald sie aktiviert wurden, als "Effector" -Zellen. T-Zellen, die nach Antigenkontakt wie ein immunologisches Gedächtnis wirken, können in "Effector Memory" -Zellen, welche bei erneutem Antigenkontakt direkt reaktiviert, und in "Central Memory" -Zellen, welche in den sekundären lymphatischen Organen ruhen, unterschieden werden^{31,32}. Der Differenzierungsweg der T-Zellen wird in verschiedenen Modellen diskutiert. Dabei sind die Übergänge zwischen den T-Zell-Subpopulationen fließend. Startpunkt ist immer die "naive" T-Zelle. Aus ihr kann nach Aktivierung entweder direkt eine "Effector" oder eine "Central Memory" -T-Zelle werden. Aus beiden Populationen können "Effector Memory" -T-Zellen entstehen und vice versa³².

Für die Selektion von aktivierten T-Zellen aus den CD4+ und CD8+ Subpopulationen werden CD38+ und HLA-DR+ als Aktivierungsmarker eingesetzt. T-Zellen, die positiv für beide Marker sind, werden als "aktiviert" bezeichnet und sind Antigen-erfahren^{30,31}. Mit zunehmender Antigen-Stimulierung und Reifung verlieren T-Zellen ihren Oberflächenrezeptor CD28 für die Ko-Stimulierung. Infolgedessen können "Memory"-T-Zellen bei nachfolgenden Expositionen gegenüber demselben Antigen eine schnellere Immunreaktion auslösen, da sie nur noch die Ag-MHC-Komplex-TZR Bindung zur Aktivierung benötigen³³. Allerdings hat eine fehlende Ko-Stimulation über CD28 auch Einfluss auf die

Qualität und Quantität der aktivierten T-Zellen. Bei "naiven" T-Zellen hat dies eine begrenzte klonale Expansion oder sogar Anergie und damit eine reduzierte Effektor-T-Zellantwort zur Folge. Die resultierende Gedächtnispopulation ist in Bezug auf die Proliferation normal, aber die Zellfunktion wird beeinträchtigt. Weiterhin expandieren diese Gedächtniszellen nicht optimal, wenn sie erneut auf "ihr" spezifisches Antigen stoßen³⁴ (**siehe Abbildung 2**).

Wie zuvor erwähnt, wird CD28 auf 80% der menschlichen CD4+ T-Zellen und 50% der CD8+ T-Zellen exprimiert²⁰. Dementsprechend wirkt eine Ko-Stimulations-Blockade über CD28 effektiver an den CD4+ T-Zellen als an den CD8+-T-Zellen. Zusätzlich nimmt der Anteil der CD28-positiven T-Zellen beim Menschen mit zunehmendem Alter ab³⁵. Damit sind ältere Patienten weniger für eine pharmakologische Unterbindung der Ko-Stimulation empfänglich. Dieser Effekt fällt besonders in der CD8+ T-Zellpopulation auf und spiegelt eine kompensatorische Anpassung des Immunsystems angesichts durchgemachter Infektionen oder Entzündungen wieder³⁵. Außerdem kann auch die altersabhängige Thymus-Involution und die damit einhergehende reduzierte Produktion von naiven CD28+ T-Zellen mit dem zunehmenden Verlust von CD28 auf den T-Zellen assoziiert sein³³. Insgesamt gibt es sowohl unter den CD4+ als auch unter den CD8+ T-Zellen CD28-negative Untergruppen, welche auch ohne Ko-Stimulation über CD28 immunreaktiv oder -suppressiv wirken können³³.

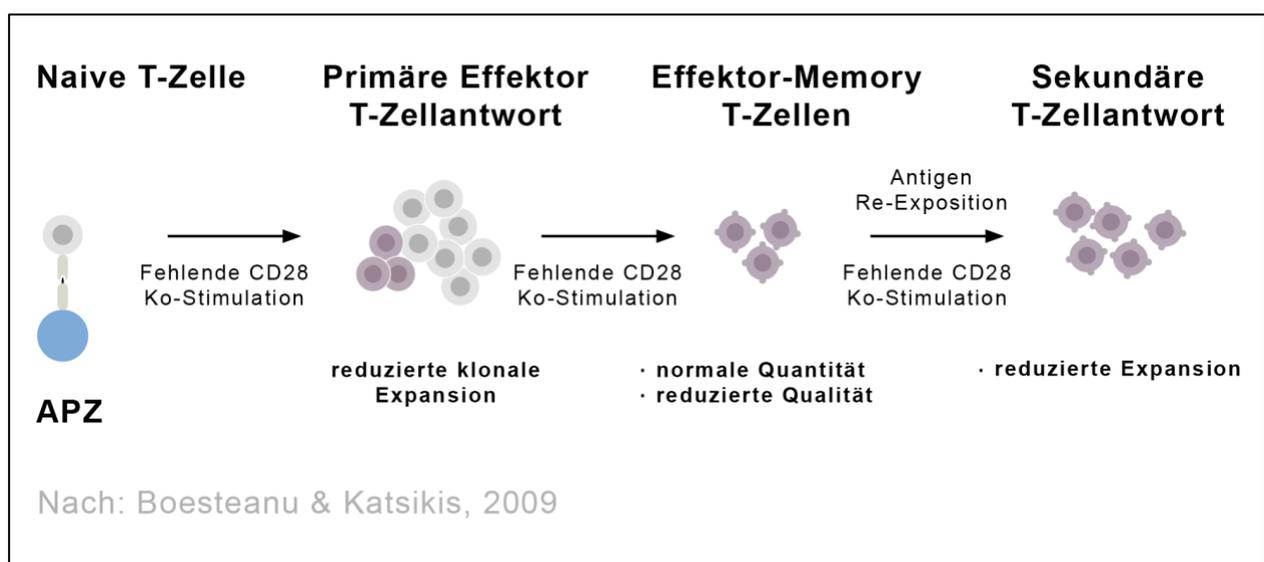


Abbildung 2. Effekt fehlender CD28-Ko-Stimulation auf die Qualität und Expansion von T-Zellen. Schematische Darstellung der Aktivierung naiver T-Zellen über die Antikörper präsentierende Zelle (APZ) ohne CD28-Ko-Stimulation und die Auswirkungen auf die weitere Entwicklung und Funktion der T-Zellen. Adaptiert nach³⁴.

1.3.4.1 Th1-/Th2-Zellen

CD4+ Zellen regulieren und modulieren die spezifische Immunantwort und können dabei in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Typ 1 CD4+ Helferzellen (Th1) sezernieren u.a. Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), um die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen zu unterstützen, welche u.a. bakterielle Pathogene bekämpfen. Außerdem produzieren sie IL-2, um zytotoxische CD8+ T-Zellen anzuregen viral infizierte Zellen zu zerstören. Zusätzlich stimulieren sie B-Zellen zur Produktion von opsonisierenden Antikörpern. Typ 2 CD4+ Helferzellen (Th2) sezernieren u.a. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, um dadurch vor allem die humorale Immunantwort, also die Produktion von Antikörpern in B-Zellen zu stimulieren¹⁹.

Bei der Th1-Entwicklung spielt der Transkriptionsfaktor T-bet eine wichtige Rolle, ebenso sowie das GATA binding protein 3 (GATA-3) bei den Th2-Zellen. Beide Helferzell-Typen arbeiten sowohl miteinander, indem sie sich bei der Steuerung der spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort gegenseitig ergänzen. Aber auch gegeneinander insofern, als die von ihnen ausgeschütteten Zytokine, die jeweils andere Immunantwort hemmen: Typ 1-Zytokine, wie z.B. IFN- γ hemmen die Typ-2-Immunantwort und Typ-2-Zytokine, wie z.B. IL-4 hemmen die Typ-1-Immunantwort³⁶.

Die Differenzierung der CD4+ Zellen wird durch das im Gewebe vorherrschende Zytokinmilieu bestimmt. Th1-Zellen entwickeln sich unter dem Einfluss von IL-12, Th2-Zellen unter dem Einfluss von IL-4. Identifiziert werden können diese Helferzellgruppen über den Chemokinrezeptor CXCR3 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3), welcher über Chemokinbindungen die Migration aktivierter T-Zellen in entzündetes Gewebe koordiniert³⁷. Er wird vorrangig auf Th1- Zellen, aber nicht auf Th2-Zellen exprimiert³⁸.

1.3.4.2 Th17-Zellen

Neben der klassischen Einteilung der T-Helferzellen in Th1 und Th2 wurde 2005 eine weitere Untergruppe der CD4+ Zellen beschrieben³⁹. Dabei handelt es sich um Th17-Zellen, welche pro-inflammatorische Zytokine der namensgebenden IL-17-Familie produzieren. Das Zytokin IL-17A fördert beispielsweise Entzündungsprozesse im Gewebe, indem es Granulozyten und Makrophagen anlockt und aktiviert. Th17-Zellen produzieren aber auch andere Zytokine⁴⁰ wie z.B. IL-17F, IL-6, IL-10 und IL-22. Th17-Zellen unterscheiden sich von Th1- und Th2-Zellen nicht nur durch die von ihnen produzierten Zytokine, sondern auch über den Weg ihrer Differenzierung. Die

Entwicklung der Th17-Zellen hängt eng mit der Entwicklung von T-regulatorischen-Zellen (Treg) zusammen, wobei sich beide T-Zelltypen gegenseitig beeinflussen.

Für die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen sind u.a. die Zytokine IL-1, IL-6 und IL-23 im Rahmen der initialen TZR-Aktivierung von Bedeutung. IL-6 aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), welcher die Transkription des Th17-spezifischen Gens ROR γ t (Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t) und dadurch die Sekretion von IL-17 und IL-23a induziert. Gleichzeitig inhibiert STAT3 die Treg-Differenzierung. Die Stimulation durch IL-1 und IL-6 fördert letztlich die Differenzierung zu Th17-Zellen und die Expression des IL-23-Rezeptors (IL-23R). Die Bindung von IL-23 an den IL-23R ist für die Differenzierung zur Th17 Zelle und die Aufrechterhaltung des Th17 Zellstatus essentiell⁴¹.

Außer IL-6 haben auch die Zytokine TGF- β (Transforming growth factor beta), IL-1 β und IL-21 Einfluss auf die Entwicklung von Th17-Zellen. IL-1 β besitzt u.a. die Fähigkeit, den mammalian target of rapamycin (mTOR)-Signalweg, einem Regulator des Zellmetabolismus, zu aktivieren. Bei der Th17-Reifung sind energieliefernde katabole Vorgängenotwendig, welche durch mTOR gesteigert werden.

Die ausdifferenzierten, IL-17 produzierenden Th17-Zellen können über den Chemokin-Rezeptor CCR6 identifiziert werden. Über die Bindung an bestimmte Chemokine vermittelt er die Chemotaxis in entzündetes oder geschädigtes Gewebe⁴².

1.3.4.3 Regulatorische T-Zellen

Neben den CD4+ T-Helferzellen Th1, Th2 und Th17 gibt es regulatorische CD4+ T-Helferzellen, welche die Immunantwort unterdrücken und die Selbsttoleranz des Immunsystems aufrechterhalten. Regulatorische T-Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften sind u.a. durch die Expression von CD25, der α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors, charakterisiert. Außerdem kann die Treg-Population über die niedrige Oberflächenexpression von CD127, der α -Kette des IL-7-Rezeptors, von konventionellen CD4+ T-Zellen unterschieden werden^{31,43,44}. Ihre Entwicklung erfolgt unter dem Einfluss von IL-2. Im Zusammenspiel mit TGF- β kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Forkhead box protein 3 (FoxP3) in der Treg-Zelle, einem wesentlichen Charakteristikum der Tregs, welcher die Zytokinexpression fördert^{45,46}. Seine Rolle als Transkriptionsfaktor besteht darin, die Expression bestimmter Proteine zu stimulieren, die von regulatorischen T-Zellen für die Immunabwehr benötigt werden. Tregs modulieren die Immunantwort auf verschiedene Weise. Sie exprimieren viele hoch-affine IL-2-

Rezeptoren (CD25), absorbieren daher viel IL-2 und entziehen diesen wichtigen Aktivierungsfaktor IL-2-abhängigen Effektor-T-Zellen, wodurch es zu einer reduzierten Proliferation und Differenzierung dieser Zellen kommt⁴⁷. Durch den Abbau von ATP (Adenosintriphosphat) reduzieren sie außerdem die für T-Effektorzellen zur Verfügung stehenden, notwendigen Energieträger.

Im Gegensatz zu naiven T-Zellen exprimieren Tregs konstitutiv und nach Aktivierung vermehrt CTLA-4. Durch Interaktion dieses Ko-Rezeptors mit den Liganden CD80 und CD86 interferieren und inhibieren Tregs die Aktivierung von T-Effektorzellen über CD28²⁴. Darüber hinaus produzieren sie anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β , die u.a. die MHC-Expression reduzieren.

Aktivierte Tregs lassen sich von naiven Tregs durch das Vorhandensein des Chemokinrezeptors CCR4 unterscheiden³¹. CCR4-Liganden sind Chemokine, welche die Migration von Tregs in entzündetes Gewebe oder andere Orte der Antigenpräsentation steuern, damit diese dort die T-Zell-Aktivierung reduzieren können^{48,49}.

1.3.4.4 Th17-/Treg-Interaktion

Tregs spielen eine wichtige Rolle bei der immunologischen Homöostase und können Immunreaktionen supprimieren⁵⁰. Demgegenüber haben die pro-inflammatorischen Th17-Zellen eine entscheidende Funktion in der Wirtsabwehr gegen Krankheitserreger und sind Schlüsselfiguren in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen⁵¹. Die Regulierung der Aktivität von Th17-Zellen durch Treg ist essentiell, um autoimmune Gewebsschädigungen zu vermeiden^{41,52}. Die Interaktion der beiden Zell-Typen beginnt schon auf der Ebene ihrer Entwicklung insofern, als beide TGF- β für die Differenzierung aus naiven T-Zellen benötigen (**siehe Abbildung 3**). Bei der weiteren Differenzierung werden dann die beiden Transkriptionsfaktoren FoxP3 und ROR γ t hochreguliert, die sich in dieser Übergangsphase gegenseitig beeinflussen. So kann FoxP3 in Gegenwart von hohen TGF- β Konzentrationen die Transkriptionsaktivität von ROR γ t inhibieren und damit die Entwicklung von Tregs begünstigen. In einem pro-inflammatorischen Zytokinmilieu (niedriges TGF- β , Anwesenheit von IL-6, IL-21 oder IL-1 β) wird dagegen die Aktivität von FoxP3 gedrosselt und die Differenzierung zu Th17-Zellen begünstigt^{19,53}. Auch im ausgereiften Zustand interagieren die beiden T-Zell-Typen miteinander. Tregs können Th17-Zellen inhibieren, indem sie das anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 produzieren. Dies führt zur Dämpfung der pro-inflammatorischen Th17-Immunantwort⁵⁴.

Neben dem Zytokinmilieu spielen auch metabolische Faktoren in den Zellen bei der Regulierung der Th17-/Treg-Balance eine Rolle. Naive T-Zellen haben einen relativ geringen Energieverbrauch und gewinnen deshalb ihre Energie hauptsächlich aus dem Citratzyklus und der Beta-Oxidation. Einen ähnlich niedrigen Energiebedarf haben auch Memory und Treg-Zellen. T-Effektorzellen dagegen erfahren durch ihre Aktivierung eine metabolische Umprogrammierung, um den Anforderungen der Proliferation und Zytokinsynthese gerecht zu werden. Diese Umprogrammierung beinhaltet das Herunterfahren der Beta-Oxidation und das Hochfahren der Zuckerverarbeitung durch die aerobe Glykolyse. Dabei spielt das mTOR-Protein eine wichtige Rolle, da es als Umgebungssensor Signale wie Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Sauerstoff und Energielevel wahrnimmt und die Stoffwechselprozesse der Zelldifferenzierung positiv beeinflusst. So ist mTOR bei inaktivierten naiven Zellen inhibiert und wird erst durch die T-Zellaktivierung funktionstüchtig. Dies führt zu einer Steigerung der Glykolyse und begünstigt die Ausdifferenzierung der naiven T-Zellen zu Effektorzellen. Naive CD4+ T-Zellen, die keine oder nur wenige mTOR Moleküle besitzen, bleiben durch ihre niedrige Energieproduktion in ihrer Entwicklung auf Memory- und Treg-Zellen beschränkt⁵⁵. Dementsprechend ist das Vorhandensein und die Aktivität von mTOR auch ein wichtiger Faktor im Gleichgewicht der Immunantwort. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tregs die Effektor-Funktionen von Th17-Zellen hemmen und dadurch die Zerstörung von Gewebe begrenzen können. Dementsprechend ist die Entwicklung dieser Zellen für die Immunsuppression bei transplantierten Patienten besonders interessant, da sie das Potential haben, die Immunreaktion gegen das Spenderorgan zu begrenzen⁵⁶.

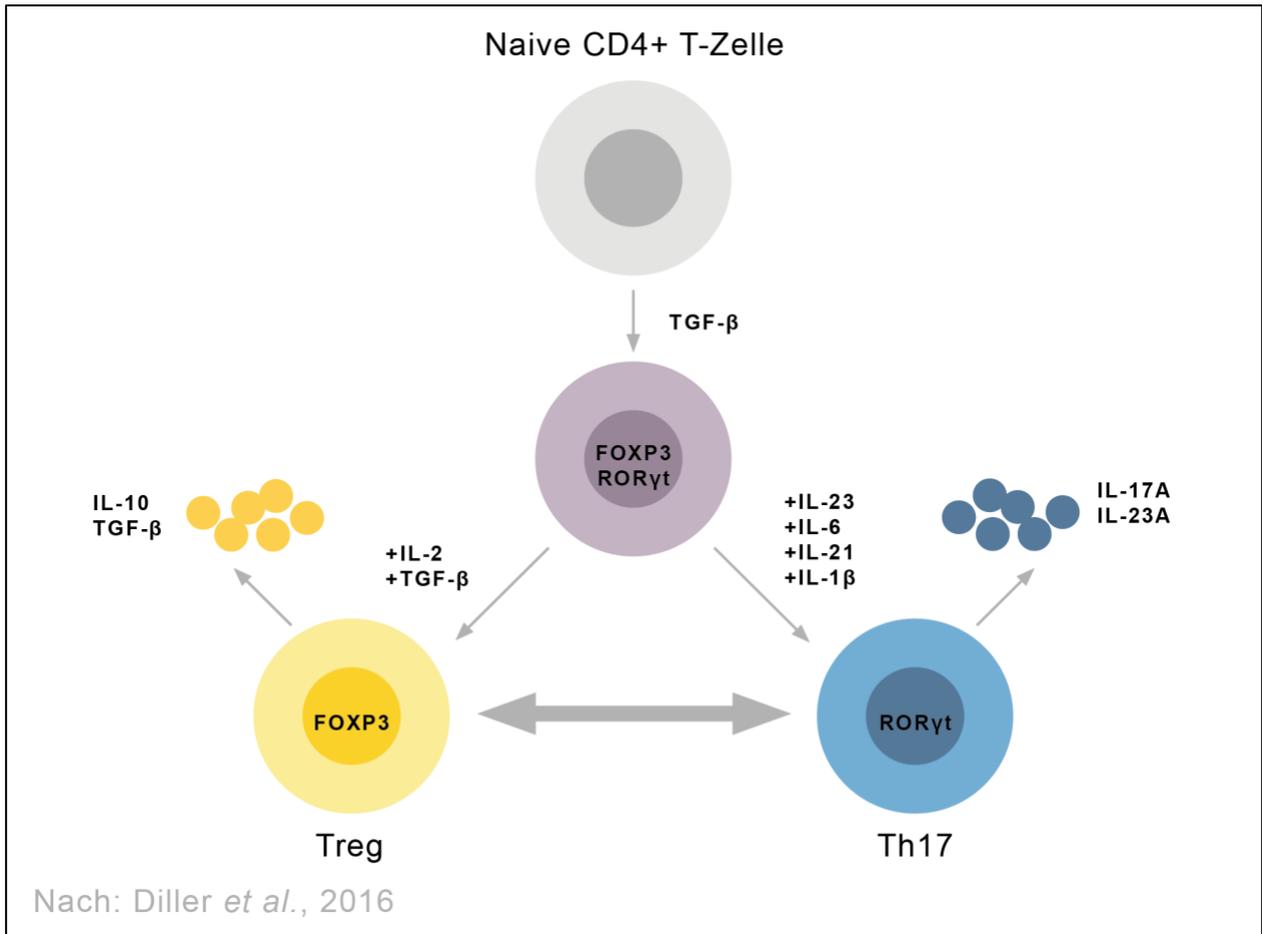


Abbildung 3. Th17-/Treg-Entwicklung und -Interaktion. Dargestellt ist die Entwicklung von T-regulatorischen (Treg)- und Th17-Zellen aus einer naiven CD4+ Vorläuferzelle. Unter dem Einfluss des Zytokins TGF-β (Transforming growth factor beta) werden die beiden Transkriptionsfaktoren FoxP3 (Forkhead-box-protein P3) und RORγt (Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t) hochreguliert und können je nach Zytokinmilieu die Differenzierung in Treg- oder Th17-Zellen begünstigen. Adaptiert nach⁵³.

1.4 Transplantationsimmunologie

1.4.1 Faktoren einer erfolgreichen Transplantation: HLA-Matching

Um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, wird viel Wert auf das "HLA-Matching" gelegt, dem immunologischen Abgleich zwischen Spender und Empfänger. Dabei spielen die MHC-Moleküle eine entscheidende Rolle. Sie werden, wie bereits erwähnt, beim Menschen als HLA-Antigene bezeichnet. Ihre genetischen Informationen sind auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 gespeichert⁵⁷. HLA-Moleküle werden unterteilt in HLA-Klasse 1-Moleküle, welche auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden und HLA-Klasse 2-Moleküle, welche hauptsächlich auf APZs wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert werden. HLA-Klasse 3-Moleküle sind Plasmaproteine, die für das HLA-Matching keine Bedeutung haben. Sowohl HLA-Klasse 1 (HLA-A, HLA-B und HLA-C) als auch Klasse 2-Merkmale (HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ) werden zur Überprüfung der Gewebsübereinstimmung herangezogen⁵⁷.

Jeder Mensch besitzt pro Genort jeweils ein mütterliches und ein väterliches HLA-Merkmal (Allel). Vererbt werden die verschiedenen HLA-Gene meist gekoppelt als Haplotyp. Beide Allele werden ko-dominant exprimiert. Dadurch dass jeder Mensch zwei HLA-Merkmale pro Gen besitzt, existieren viele tausende Kombinationsmöglichkeiten⁶. Der HLA-Typ kann mit serologischen Methoden bestimmt werden, jedoch werden heute hauptsächlich molekularbiologische Methoden wie die Polymerase Chain Reaction (PCR) zur Gewebetypisierung benutzt. Die größte Chance auf eine Übereinstimmung der HLA-Antigene (Match) besteht zwischen nahen Verwandten, wie Geschwistern oder Eltern. Je mehr Nichtübereinstimmung besteht, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion.

Zusätzlich zur HLA-Typisierung wird bei allen Empfängern ein Screening auf HLA-Antikörper durchgeführt. Dabei wird Serum der Empfänger mit definierten HLA-Antigenen inkubiert und so auf bereits vorhandene (präformierte) Antikörper getestet. Eine Sensibilisierung gegenüber bestimmten HLA-Antigenen kann durch Schwangerschaften, Bluttransfusionen oder vorangegangene Transplantationen eintreten. Unmittelbar vor Transplantation wird aktuelles Serum des Empfängers mit Milz-Zellen des Spenders, die HLA-Klasse I- und II-Antigene exprimieren, inkubiert (Crossmatch) und so auf Antikörper gegen Spenderzellen getestet. Ein positives Crossmatch mit Nachweis donorspezifischer Antikörper beim Empfänger ist eine Kontraindikation für eine Transplantation¹⁹.

1.4.2 Abstoßungsreaktionen

1.4.2.1 Identifizierung von Alloantigenen durch T-Zellen

Wenn ein Organ in ein nicht-identisches Individuum der gleichen Spezies verpflanzt wird, handelt es sich definitionsgemäß um eine Allotransplantation. Die Reaktion des Empfängers auf diesen Fremdkörper wird als Alloimmunantwort bezeichnet. Ohne Immunsuppression steht am Ende einer Abstoßungsreaktion der irreversible Funktionsverlust des Spenderorgans⁵⁷.

Anhand des zeitlichen Verlaufes unterscheidet man drei unterschiedliche Typen der Abstoßungsreaktion: Die hyperakute Abstoßung tritt innerhalb von Minuten nach Transplantation ein und wird durch schon vor der Transplantation existierende, präformierte donorspezifische Antikörper ausgelöst. Bei ausreichend guter Vorbereitung, insbesondere durch HLA-Typisierung und einen HLA-Antikörpertest sollte eine hyperakute Rejektion heutzutage nicht mehr auftreten. Die akute Abstoßung beruht auf der Aktivierung von Lymphozyten nach Transplantation und kann dementsprechend einige Tage nach Transplantation, aber auch erst Monate oder Jahre später eintreten. Die chronische Rejektion ist das Ergebnis von einzelnen oder mehreren akuten oder auch subklinischen Abstoßungsreaktionen⁶.

Aus immunologischer Sicht gibt es zwei Formen der Immunantwort auf körperfremde MHC-Moleküle. Bei der direkten Immunantwort werden allogene MHC-Moleküle auf der Oberfläche von Spender-Zellen durch körpereigene T-Zellen erkannt. Davon zu unterscheiden ist die indirekte Immunantwort, bei der Peptide von Spender MHC-Molekülen von MHC-Molekülen auf körpereigenen APZs präsentiert werden. Letztendlich kommt es in beiden Fällen zu einer T-Zellaktivierung durch fremde MHC-Antigene auf den Spenderzellen.

1.4.2.2 Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen

Das erste Signal zur Stimulierung der T-Zellen wird über den TZR-CD3 Komplex gegeben. Das zweite benötigte Signal hängt von den Rezeptor-Liganden Interaktionen zwischen T-Zelle und APZ ab. Diese Ko-Stimulation kann über verschiedene Rezeptoren erfolgen, z.B. CD28-B7 (**s. Kapitel 1.3.3**) oder auch CD154-CD40. Die Kombination von Signal 1 und 2 gibt daraufhin den Stimulus für nachgeschaltete Signalkaskaden, die intrazelluläre Prozesse auslösen. Zu diesen Stoffwechselwegen gehören u.a. der Calcium-Calcineurin-Weg, der MAP-Kinase-Weg (Mitogen-activated protein) und der

Proteinkinase-C-Weg^{57,58}. Diese Signalkaskaden aktivieren intrazelluläre Transkriptionsfaktoren, wodurch die Produktion von Zytokinen und anderen Molekülen angeregt wird. Dazu zählen beispielsweise CD25 (= α -Kette des IL-2R), CD154 (= CD40 Ligand) sowie IL-2 und IL-15. Letztere bilden das dritte Signal auf dem Weg zur Aktivierung der T-Zellen, indem sie über den mTOR-Weg oder den Phosphoinositid-3-Kinase-Weg die Proliferation der T-Zelle auslösen.

1.4.2.3 Molekulare Mechanismen der Transplantatabstoßung

Bei aktivierten T-Zellen kommt es zur klonalen Expansion (Proliferation) und zur Differenzierung mit Produktion einer Vielzahl von Zytokinen. CD8+ zytotoxische T-Zellen und CD4+ T-Helferzellen können das Transplantat durch die zelluläre und durch die humorale Immunantwort schädigen. CD4+ Effektorzellen wie z.B. Th1- und Th17-Zellen sezernieren Zytokine, die Leukozyten rekrutieren und aktivieren. IL-17, IFN- γ und TNF sind dabei wichtige Zytokine für Makrophagen und Neutrophile. Diese Zellen verursachen eine Gewebsschädigung durch Freisetzung lysosomaler Enzyme und freier Radikale. Durch positive Rückkopplung kommt es zur Einwanderung weiterer Leukozyten in das Gewebe und damit zur Verstärkung der Entzündungsreaktion. Zytokine stimulieren außerdem die Expression von HLA-Klasse 1- und 2-Molekülen auf Gefäßendothelzellen, wodurch diese von T-Effektorzellen erkannt werden können^{47,59}. Th2-Zellen produzieren Zytokine, welche die Aktivierung von B-Zellen und damit die spezifische Antikörperproduktion (humorale Immunreaktion) stimulieren³⁶. CD8+ zytotoxische T-Zellen (Tc-Zellen) wirken zytotoxisch, indem sie über HLA-Klasse 1-Moleküle an Spenderzellen binden, Perforine sezernieren, welche die Zellmembran perforieren und dann Granzyme in die Zelle einschleusen, welche in der Zielzelle Apoptose auslösen⁶⁰. Ein Teil der donorspezifischen T- und B-Zellen entwickelt sich zu Memory-Zellen, welche als spezifisches immunologisches Gedächtnis fungieren und bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen eine schnellere und stärkere Immunantwort auslösen. Dementsprechend muss besonders bei einer wiederholten Transplantation auf vorhandene HLA-Antigene getestet werden, um hyperakute Abstoßungsreaktionen zu vermeiden.

1.4.2.4 Histopathologie der Transplantatabstoßung - Banff-Klassifikation

Die Einteilung der pathologischen Veränderungen bei Abstoßungsreaktionen erfolgt nach dem Typ der Abstoßungsreaktion (zellulär oder humoral), nach dem Schweregrad und nach dem Vorliegen akuter oder chronischer Veränderungen. Eine akute Rejektion kann vor allem durch Reduktion der Immunsuppression, aber auch ohne erkennbare Ursache entstehen. Zelluläre und humorale Rejektionen weisen histopathologisch unterschiedliche Veränderungen auf (**siehe Tabelle 1**). Bei der humoralen Rejektion finden sich beispielsweise Komplement-Abbauprodukte, insbesondere C4d. Selbstverständlich können zelluläre und humorale Rejektion auch gleichzeitig auftreten. Endstadium vieler Rejektionen sind chronische Veränderungen wie Transplantatglomerulopathie, Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie^{47,61}.

Im Verlauf einer Nierentransplantation ist die Nierenbiopsie weiterhin der Goldstandard, um intrarenale Funktionsstörungen, wie z.B. Abstoßungsreaktionen, exakt diagnostizieren und differenzieren zu können. Die histopathologische Untersuchung der Transplantatniere ermöglicht nicht nur den Nachweis einer Abstoßungsreaktion, sondern gibt auch Hinweise auf Pathogenese (zellulär vs. humoral), Schweregrad und chronische Veränderungen. Darüber hinaus können wichtige Differentialdiagnosen, wie z.B. die Rekurrenz einer Grunderkrankung oder Virusinfektionen festgestellt werden. Die Banff-Klassifikation wurde 1991 in Banff (Provinz Alberta, Kanada) eingeführt und wird seitdem regelmäßig aktualisiert⁶². Sie dient der objektiven, standardisierten und reproduzierbaren Einteilung unterschiedlicher histopathologischer Diagnosen, insbesondere der Abstoßungsreaktion.

Tabelle 1. Banff-Klassifikation. Adaptiert nach der "Banff Working Classification of Renal Allograft Pathology", 2013⁶³.

Kategorie	
1	Normale Biopsie oder unspezifische Veränderungen
2	<p>Antikörper-vermittelte Veränderungen (ABMR: Antibody mediated rejection) Für die Diagnosen müssen jeweils alle 3 Faktoren zutreffen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Akut / Aktive ABMR <ul style="list-style-type: none"> • Histologischer Nachweis akuter Gewebsschäden • Nachweis von Antikörperinteraktion mit dem Gefäßendothel • Serologischer Nachweis von Donor-spezifischen Antikörpern (HLA oder andere) • Chronisch / Aktive ABMR <ul style="list-style-type: none"> • Morphologischer Nachweis von chronischen Gewebsschäden • Nachweis von Antikörperinteraktion mit dem Gefäßendothel • Serologischer Nachweis von Donor-spezifischen Antikörpern (HLA oder andere) • C4d-Ablagerungen ohne morphologischen Nachweis einer Rejektion <ul style="list-style-type: none"> • Lineare C4d-Färbung in peritubulären Kapillaren • Keine Gewebsläsionen hinweisend auf akut oder chronisch aktive ABMR • Keine akute zellvermittelte Rejektion oder Borderline-Veränderungen
3	<p>Borderline Veränderungen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Verdächtig auf akute T-Zell vermittelte Abstoßung
4	<p>T-Zell-vermittelte Abstoßung (TCMR: T-cell mediated rejection)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Akute TCMR <ul style="list-style-type: none"> • Einteilung in 5 Schweregrade • Chronisch aktive TCMR <ul style="list-style-type: none"> • Intimafibrose mit mononukleären Infiltraten, Neointima- Bildung
5	<p>Interstitielle Fibrose (IF) und Tubulus-Atrophie (TA)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Einteilung in 3 Schweregrade
6	<p>Sonstige Veränderungen nicht auf akute oder chronische Rejektion zurückzuführen</p> <ul style="list-style-type: none"> • BK-Virus Nephropathie • Posttransplant lymphoproliferative Störungen • Calcineurin-Inhibitor-Nephrotoxizität • Akute Tubulusschädigung • Rekurrenz der Grunderkrankung • <i>de novo</i> Glomerulopathie • Pyelonephritis • Medikamentös induzierte interstitielle Nephritis

1.4.3 Immunsuppression bei Nierentransplantation

Die pharmakologischen Entwicklungen der letzten Jahrzehnte haben zu einer immensen Erweiterung des immunsuppressiven Repertoires für organtransplantierte Patienten geführt. Bei den meisten dieser Medikamente treten jedoch teilweise nicht unerhebliche Nebenwirkungen auf, die neben weiteren Verbesserungen in Bezug auf Wirksamkeit und Spezifität der wesentliche Antrieb für die anhaltende Suche nach neuen Immunsuppressiva sind⁶⁴. Da nierentransplantierte Patienten langfristig auf die immunsuppressive Medikation angewiesen sind, ist ein sorgfältiges Abwägen zwischen den zur Verfügung stehenden Wirkstoffen essenziell.

1.4.3.1 Standard-Immunsuppressiva

Ziel der medikamentösen Therapie nach Transplantation ist die Verbesserung des Patienten- und Transplantatüberlebens unter Reduzierung der pharmakologischen Nebenwirkungen auf ein Minimum. Die Standard-Erhaltungs-Immunsuppression besteht aus einer Kombination verschiedener Substanzklassen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. Zeitlich voneinander unterscheiden kann man die Induktionstherapie von der Erhaltungstherapie. Die Kidney Disease: Improving Global Outcomes-Leitlinien (KDIGO)⁶⁵ von 2009 geben als Induktionstherapie erster Wahl die Gabe eines IL-2-Rezeptor-Blockers an, für Patienten mit hohem immunologischem Risiko wird ein Lymphozyten-depletierender Antikörper empfohlen. Als Erhaltungstherapie wird der Einsatz von Calcineurin-Inhibitoren und einer anti-proliferativen Substanz mit oder ohne Einsatz von Glucocorticoiden empfohlen. Die verabreichte Dosis sollte so niedrig wie möglich gehalten und regelmäßig reevaluiert werden^{66,67}.

1.4.3.2 Glucocorticoide

Seit Entdeckung der aus der Nebennierende stammenden Kortikosteroide vor über 60 Jahren gehören Glucocorticoide (GC) zu den am häufigsten eingesetzten Medikamenten. Pharmakologisch leiten sich Wirkstoffe wie Prednisolon und das wirksamere Methylprednisolon von Steroidhormonen der Glucocorticoid-Familie ab. Der immunsuppressive Wirkmechanismus des natürlich vorkommenden Hormons und seiner synthetischen Analoga beruht u.a. auf einer Blockade der Synthese und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-2, sowie von Adhäsions-Molekülen, Chemokinen, Prostaglandinen und reaktiven Sauerstoffradikalen⁴⁷. GCs unterbinden die Synthese dieser Faktoren, indem sie sich im Zytoplasma der Zielzelle an

den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) binden. Der GC/GR-Komplex transloziert anschließend in den Zellkern und bindet dort an spezifische DNA-Regulationselemente, um so die Expression bestimmter Gene und Transkriptionsfaktoren zu verändern⁶⁸. Über die Hemmung der IL-2-Produktion unterdrücken GC die Proliferation von T-Helferzellen⁴⁷. Ihre anti-inflammatorische und immunsuppressive Wirkung wird hauptsächlich durch die Funktionshemmung und quantitative Verminderung der Lymphozyten erreicht. Der schnelle und starke Einfluss von GC auf nahezu alle Bestandteile des Immunsystems macht GC trotz der bekannten, nicht unerheblichen Nebenwirkungen zu einem auch weiterhin unverzichtbaren Standard-Immunsuppressivum der Transplantationsmedizin. GC werden in der Induktions- und Erhaltungstherapie sowie auch zur Behandlung von akuten Rejektionen eingesetzt. Die vielfältigen Nebenwirkungen umfassen vor allem die arterielle Hypertonie, den Steroid-Diabetes, die Osteoporose, gastrointestinale Nebenwirkungen sowie zentralnervöse Symptome wie Schlafstörungen und psychische Störungen⁶⁴.

1.4.3.3 Calcineurininhibitoren

Calcineurininhibitoren (CNI) wie Cyclosporin A (CyA: z.B. Sandimmun[®]) und Tacrolimus (Tac: z.B. Prograf[®]) reduzieren die Transkription von bestimmten T-Zell Genen. Die Entwicklung der CNIs, zunächst CyA später Tac, revolutionierte die Transplantationsmedizin, weil dadurch ein erheblich besseres Transplantatüberleben bei vergleichsweise günstigerem Nebenwirkungsprofil (Ganzkörperbestrahlung, Glucocorticoide, Azathioprin) ermöglicht wurde. Beide Substanzen sind bis heute Eckpfeiler der immunsuppressiven Erhaltungstherapie⁶⁴.

Bei Cyclosporin A handelt es sich um ein Peptid, welches an das in den meisten Zellen exprimierte Protein Cyclophilin bindet. Der Komplex aus beiden Proteinen inhibiert die enzymatische Aktivität der Calcium-/Calmodulin-aktivierten Phosphatase Calcineurin. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor NF-ATc (nuclear factor of activated T-cells) nicht dephosphoryliert und gelangt nicht in den Zellkern. Als Folge wird die IL-2-Produktion und damit die T-Tell-Aktivierung gehemmt. Der Komplex aus Tacrolimus (frühere Bezeichnung FK506) und FK506-binding protein (FKBP) hemmt ebenfalls die Phosphatase Calcineurin, dadurch die Dephosphorylierung von NF-ATc und die IL-2-Produktion von T-Zellen⁶⁹. Beide Substanzen, CyA und Tac haben ähnliche, aber nicht identische unerwünschte Arzneimittelwirkungen, darunter die akute und die chronische Nephrotoxizität. Dabei kommt es zu reversiblen (Vasokonstriktion) und irreversiblen

Veränderungen wie interstitieller Fibrose und Glomerulosklerose, u.a. vermittelt durch die vermehrte Produktion von mesangialen Matrixproteinen^{70,71}. Diese Mechanismen führen schließlich zur Verminderung der Funktionsleistung der Transplantatniere⁷². In der Banff-Klassifikation^{62,63} werden diese irreversiblen Veränderungen im Nierengewebe unter der Kategorie sechs "Sonstige Veränderungen" als Calcineurin-Inhibitor-Nephrotoxizität geführt.

Heutzutage wird Tac in der Transplantatmedizin häufiger eingesetzt als CyA, da es mit einem geringeren Risiko für akute Rejektionen, einer besseren Nierenfunktion und einem besseren Transplantatüberleben assoziiert ist^{73,74}. Insgesamt ist Tac im Vergleich zu CyA die immunsuppressiv "potentere" Substanz. Die Nebenwirkungsprofile beider Substanzen sind vergleichbar, jedoch nicht identisch: beide erhöhen das Infektions- und Malignitätsrisiko, beide können nephrotoxisch wirken. Die Behandlung mit CyA wird u.a. mit höherem Blutdruck, Hyperlipidämie und Gingivahyperplasie verknüpft, während Tacrolimus u.a. mit neurologischen Nebenwirkungen, Diabetes mellitus, BK-Nephropathie und Haarausfall assoziiert ist⁶⁴.

1.4.3.4 Antimetabolite

Antimetabolite sind Substanzen, welche die Purin- oder Pyrimidinsynthese und dadurch die DNA-Synthese hemmen. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind Azathioprin (AZA) und Mycophenolatmofetil (MMF). AZA wird in einigen Fällen nach Transplantation noch immer eingesetzt, ist jedoch zum einen immunsuppressiv weniger potent als MMF und hat zum anderen vor allem langfristig ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil, insbesondere bezüglich Myelotoxizität, sowie der erhöhten Inzidenz von Hauttumoren.

MMF (CellCept®) wird seit den 1990er Jahren eingesetzt. Es handelt sich um eine sogenannte Prodrug, die erst nach der Umwandlung in den aktiven Metaboliten Mycophenolsäure (MPA) in der Leber wirksam wird^{47,64}. Das Präparat Myfortic® ist eine magensaftresistente (enteric-coated) Formulierung von Mycophenolat-Natrium, die eine verzögerte Freisetzung im Dünndarm ermöglicht, um dadurch eine bessere Verträglichkeit zu erzielen. Die Wirkung von MPA beruht auf der Hemmung der Purin-Biosynthese durch Inhibition des Enzyms Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH), wodurch die DNA-Synthese gehemmt wird⁷⁵. Lymphozyten sind im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Zellen bei der Zellteilung besonders auf die IMPDH-Aktivität angewiesen, weil ihnen der Salvage-Pathway zur Purin-Synthese nicht zur Verfügung steht. Daher wirkt MPA relativ spezifisch antiproliferativ auf Lymphozyten^{47,64}. MPA ist

Azathioprin in Bezug auf das Auftreten von Rejektionen und das Transplantatüberleben deutlich überlegen. Andererseits ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von opportunistischen Infektionen, wie z.B. Cytomegalievirus-Infektionen, und gastrointestinalen (GI) Nebenwirkungen unter MPA erhöht⁷⁶. Im Gegensatz zu CNIs hat MPA jedoch keine bekannten nephrotoxischen Nebenwirkungen und wird daher in der Immunsuppression von nierentransplantierten Patienten standardmäßig verwendet^{72,75}. Um das Auftreten von MMF-induzierten GI-Nebenwirkungen zu reduzieren, kann an Stelle von CellCept® das magensaftresistente Myfortic® eingesetzt werden, welches durch seine Beschichtung die Reizung des oberen GI-Traktes minimieren soll. Dadurch können unter Umständen Dosisreduktionen oder Therapieabbrüche wegen GI-Irritationen vermieden und so die klinische Wirksamkeit verbessert werden⁷⁷.

1.4.3.5 mTOR-Inhibitoren

Sirolimus (Rapamycin, Rapamune®), der erste zugelassene mTOR-Inhibitor (mTORi), ist ein Makrolid, welches 1975 aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* im Boden der Osterinsel Rapa Nui isoliert wurde. Everolimus (Certican®) ist ein Derivat von Sirolimus mit dem gleichen Wirkmechanismus, es weist jedoch eine höhere Bioverfügbarkeit und eine kürzere Halbwertszeit auf⁷⁸. Im Gegensatz zu CyA und Tac, welche die Produktion von Zytokinen hemmen, inhibieren mTORis den Effekt von Zytokinen auf die Zelle, indem die Proteinkinase mTOR gehemmt wird. Über verschiedene Zwischenschritte wird letztlich der Zellzyklus am Übergang von der G₁- zur S-Phase blockiert. Dadurch kommt es zur Hemmung von Aktivierung und Proliferation. Somit wirken mTORis antiproliferativ auf T- und B-Zellen, aber auch auf glatte Muskelzellen und Fibroblasten.

In Meta-Analysen zur Induktionstherapie nierentransplantierten Patienten unter Therapie mit mTORis und CNIs zeigten sich bei mTORi-behandelten Patienten bessere Nierenfunktionswerte als bei Patienten unter ausschließlicher CNI-Medikation⁷⁹. Andererseits zeigten sich bei diesen Patienten häufiger Dyslipidämien, Lymphozelen und eine beeinträchtigte Wundheilung⁷⁹. In einer Meta-Analyse von Patienten, deren Erhaltungstherapie ein Jahr nach Transplantation von CNI auf mTORi umgestellt wurde, zeigten sich ebenfalls verbesserte Nierenfunktionswerte. Allerdings war das Rejektionsrisiko in der mTORi-Gruppe im Vergleich zur CNI-Gruppe erhöht⁸⁰. Darüber hinausgehend konnten Liefeldt *et al.*⁸¹ zeigen, dass die Therapie mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus im Vergleich zu CyA mit einem höheren Risiko für die Entwicklung donor-

spezifischer Antikörper und das Auftreten von Antikörper-vermittelten Rejektionen assoziiert ist.

1.4.3.6 Belatacept

Wie eingangs erwähnt, benötigen T-Zellen für ihre Aktivierung neben dem ersten Signal (TZR-Ag/MHC) eine Ko-Stimulation über ein zweites Signal (CD28-B7). Dieses zweite Signal kann durch das von T-Zellen exprimierte CTLA-4 gehemmt werden, welches homolog zu CD28 aber mit wesentlich höherer Affinität an die Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) bindet und hemmend auf die T-Zell-Aktivierung wirkt. Dementsprechend ist CTLA-4 ein interessanter Ansatzpunkt für die pharmakologische Modulation der Immunantwort⁴⁷.

CTLA-4-Ig ist ein Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären Domäne des CTLA-4-Moleküls, gebunden an den modifizierten Fc-Teil des humanen Immunglobulins IgG1. Es wurde 2005 unter dem Namen Abatacept (Orencia[®]) als erster selektiver Ko-Stimulations-Hemmer für die Behandlung am Menschen zugelassen. Allerdings besitzt Abatacept eine deutlich höhere Bindungsaffinität für CD80 als für CD86, so dass für eine effektive Inhibition der CD28-B7.2-Ko-Stimulation hohe Konzentrationen benötigt werden^{21,24}. Um eine potentere Immunsuppression zu erreichen, wurde ein Derivat des Abatacept mit einer höheren Affinität zu CD86 entwickelt⁸². Dieses Fusionsprotein unterscheidet sich von seinem Vorgängerpräparat in zwei Aminosäuren in der Ligandenbindenden Region von CTLA-4 und wurde 2011 unter dem Namen Belatacept (Nulojix[®]) auf den Markt gebracht⁸².

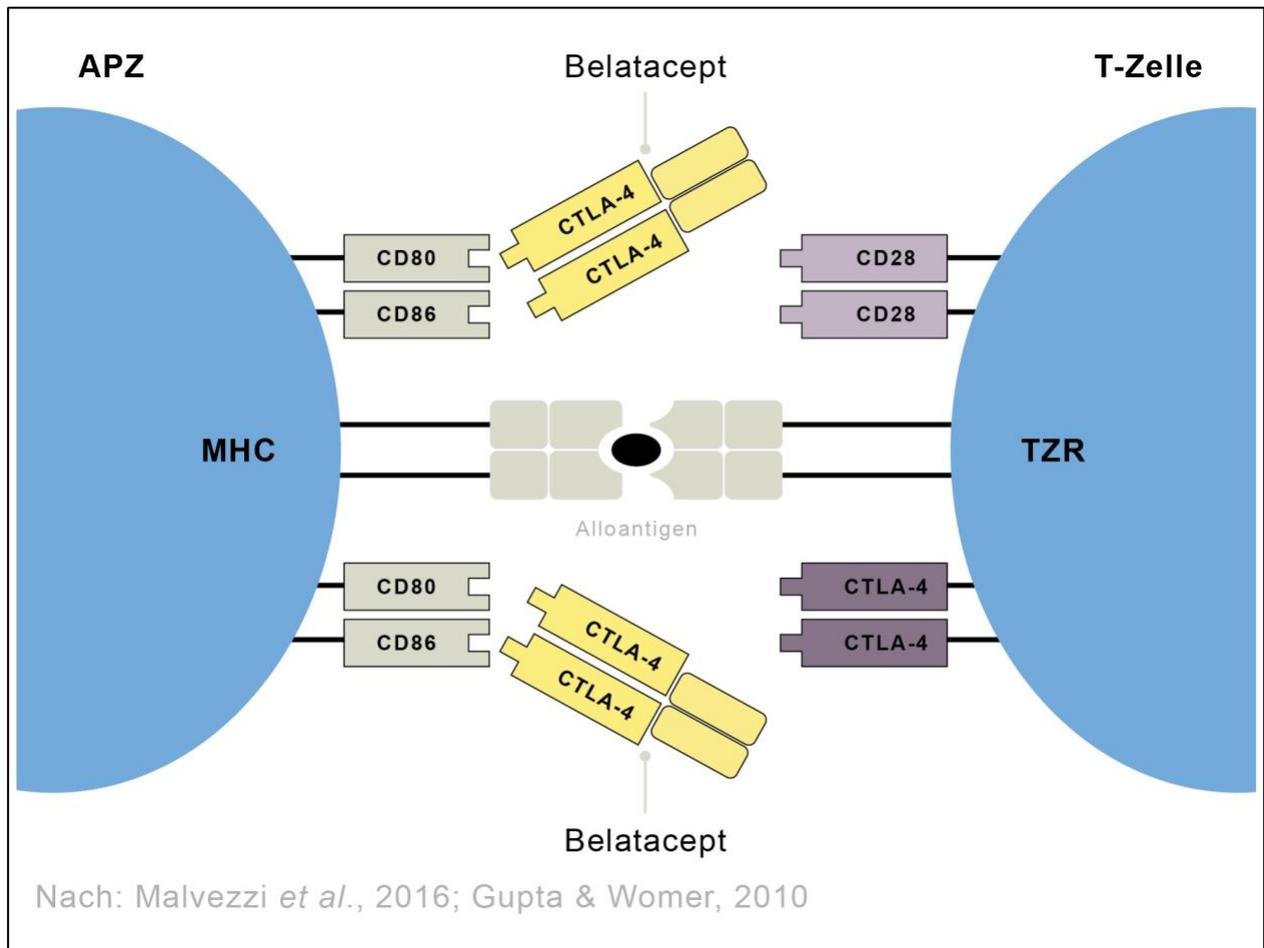


Abbildung 4. Ko-Stimulationsblockade durch Belatacept. Schematische Darstellung der pharmakologischen Wirkung des Fusionsproteins Belatacept, welches aus 2 CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) Untereinheiten besteht, die an den modifizierten Fc-Teil des humanen Immunglobulins IgG1 gebunden sind. Dieses bindet an CD80 und CD86 auf der Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) und verhindert dadurch die Interaktion mit dem CD28-/CTLA-4-Rezeptor auf der T-Zelle. Obwohl die Bindung zwischen Antigen-MHC (Major Histocompatibility Complex) und T-Zell Rezeptor (TZR) davon unbeeinträchtigt ist, wird durch Blockade der Ko-Stimulation die T-Zell Aktivierung gehemmt. Adaptiert nach^{26,27}.

Belatacept kann die T-Zellaktivierung blockieren und so bei nierentransplantierten Patienten die Entwicklung einer Abstoßungsreaktion verhindern. Es ist im Gegensatz zu CNIs nicht nephrotoxisch und weist ein günstigeres Risikoprofil in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen auf⁸³. Ein positiver Nebeneffekt der parenteralen Gabe besteht in der besseren und objektivierbaren Adhärenz. Aufgrund des gehäuftten Auftretens von Epstein-Barr-Virus (EBV)-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen bei primären EBV-Infektionen sollten nur Patienten mit bereits durchgemachter EBV-Infektion mit Belatacept behandelt werden⁸³.

Die Vor- und Nachteile von Belatacept als Immunsuppressivum für die *de novo*-Therapie im Vergleich zur üblichen CNI-Medikation wurden in mehreren Phase-III-Studien untersucht. Die "Belatacept Evaluation of Nephroprotection and Efficacy as First-Line

Immunsuppression Trial"-Studie (BENEFIT) und die "BENEFIT-EXTended Criteria Donors"-Studie (BENEFIT-EXT) sind große, multizentrische, prospektive Studien an nierentransplantierten Patienten, in der zwei Belatacept- basierte Regime mit einem CyA-basiertem Regime verglichen wurden. Die Ergebnisse zeigen einen Vorteil der Belatacept-Gruppen bezüglich der Nierenfunktion im Vergleich zur Cyclosporin-Gruppe bei gleichem Transplantat- und Patienten-Überleben sowohl nach einem Jahr^{84,85}, als auch nach drei Jahren^{86,87}. Allerdings kam es bei Belatacept-behandelten Patienten im ersten Jahr zu einer höheren Inzidenz und einem höheren Schweregrad von Rejektionen im Vergleich zu CyA-behandelten Patienten⁸⁴. Darüber hinaus wurde bei Belatacept behandelten Patienten, insbesondere bei EBV-negativen Patienten, eine erhöhte Inzidenz von Posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLDs) gefunden⁸⁴⁻⁸⁷. In der Langzeit-Auswertung (7Jahre) der beiden Studien fand sich weiterhin im Vergleich zu den CyA-behandelten Patienten eine bessere Nierenfunktion bei mit Belatacept behandelten Patienten^{88,89}. In einer post-hoc-Analyse der BENEFIT- und der BENEFIT-EXT-Studie konnte in dem 7-jährigen Beobachtungszeitraum bei Balatacept-behandelten Patienten im Vergleich zu CyA-behandelten Patienten außerdem ein geringeres Auftreten von *de novo* DSA belegt werden⁹⁰. Die dargestellten Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass in Belatacept ein potentes Medikament zur erfolgreichen Immunsuppression nach Nierentransplantation gefunden wurde.

1.5 Ziel der Studie

Belatacept ist ein vielversprechendes Immunsuppressivum, welches im Gegensatz zu Calcineurin-Inhibitoren nicht nephrotoxisch wirkt und daher insbesondere bei Patienten mit nachgewiesener CNI-Nephrotoxizität als Rescue-Therapie eingesetzt werden kann. Bedingt durch seine blockierende Wirkung auf die Ko-Stimulation wird die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen beeinflusst, welche für die Pathogenese von Rejektionen eine herausragende Bedeutung haben.

Unter Belatacept-Induktionstherapie wurde im Vergleich zu CNIs einerseits eine verbesserte Nierenfunktion, andererseits aber auch eine erhöhte Inzidenz und ein erhöhter Schweregrad von akuten Rejektionen registriert^{84,86}. Studien, die den Einfluss der Ko-Stimulationsblockade auf die verschiedenen funktionellen T-Zell-Untergruppen bei nierentransplantierten Patienten untersuchen, sind rar. Eine bessere Kenntnis von den *in vivo* Veränderungen der T-Zell-Zusammensetzung unter Belatacept ist ein wichtiger Schritt, um Abstoßungsreaktionen unter Belatacept-Therapie in Zukunft effektiver verhindern zu können. Klinisch interessant ist die Anwendung von Belatacept als Option bei Patienten, die an Arzneimittelnebenwirkungen unter Standard-Therapie mit CNIs oder mTORis leiden. Klinische Studien zu diesem Einsatz von Belatacept gibt es vereinzelt über die Umstellung von CNIs, jedoch wurde die Konversion von mTORis bisher nicht erforscht.

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir in der vorliegenden Studie durchflusszytometrisch die T-Zell-Subpopulationen nierentransplantierten Patienten vor und nach Umstellung von CNI und mTORi auf Belatacept. Besonderes Augenmerk legten wir dabei auf die pro-inflammatorischen Th17-Zellen und ihr namensgebendes Interleukin IL-17A. Zusätzlich werteten wir klinisch relevante Nierenfunktionsparameter wie die glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) und die Albuminurie aus, um ergänzend auch funktionelle Veränderungen nachvollziehen zu können. Im Zuge der Analyse der Ergebnisse dieser Studie hoffen wir, den Effekt der Ko-Stimulationsblockade auf T-Zellen besser zu verstehen und so den zukünftigen Einsatz von Belatacept, eventuell in Kombination mit anderen Immunmodulatoren, als Induktions- oder Rescue-Therapie weiter etablieren zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

2.1.1 Studienablauf und -medikation

In dieser Studie untersuchten wir 38 nierentransplantierte Patienten über einen Zeitraum von 12 Monaten. Dabei wurden 10 Patienten von einem CNI-Regime (Prograf[®], Advagraf[®], Sandimmun[®]) und neun Patienten von einem mTORi-Regime (Certican[®], Rapamune[®]) kontrolliert auf Belatacept umgestellt. Parallel dazu schlossen wir die gleiche Anzahl vergleichbarer Kontrollpatienten (CNI n=10, mTORi n=9) mit unverändert fortlaufender Erhaltungs-Immunsuppression ein. Die Umstellung der Studienpatienten von ihrer Ausgangsmedikation auf Belatacept geschah in einem Zeitraum von vier Wochen (**siehe Abbildung 5**). Die zusätzliche immunsuppressive Medikation, bestehend aus MPA (CellCept[®] oder Myfortic[®]) und / oder Glucocorticoiden, wurde unverändert beibehalten. Die Blutentnahmen für die Studie erfolgten jeweils parallel zu den Belatacept-Gaben in der Klinik vor der Belatacept-Infusion. Die Zubereitung und Verabreichung von 5mg/kg Belatacept intravenös geschah entsprechend den Angaben des Herstellers. Unmittelbar vor der ersten Belatacept-Gabe wurden die Proben für die Baseline (BL) -Messung gewonnen. Darauf folgten alle drei Monate (M3, M6, M9, M12) Probenentnahmen für die Studie.

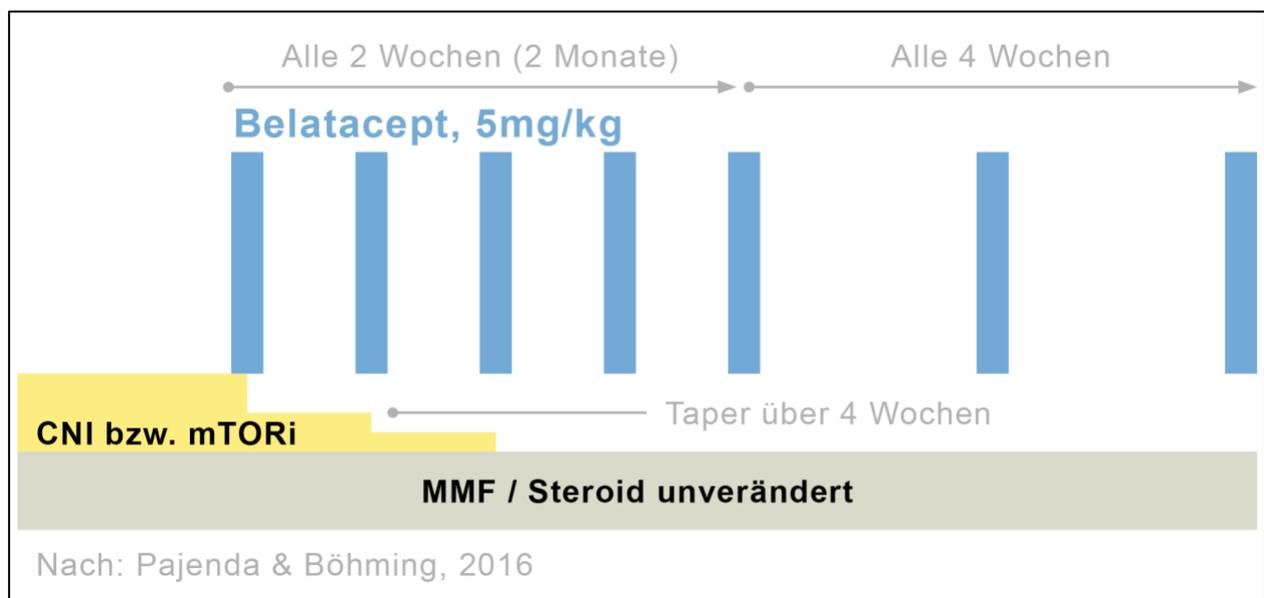


Abbildung 5. Schema zur Umstellung von CNI / mTORi auf Belatacept. Die blauen Balken symbolisieren die Belatacept-Gaben, die gelben Balken die Ausgangsmedikation in Form von CNI oder mTORi und der graue Balken zeigt die unveränderte Gabe von MMF und Steroiden. Nach Pajenda⁹¹. CNI, Calcineurin-Inhibitor; MMF, Mycophenolatmofetil; mTORi, mammalian target of rapamycin-Inhibitor.

Tabelle 2. Tabellarische Darstellung der Umstellung auf Belatacept inkl. Dosierungen.

Belatacept i.v. Umstellungsregime	mTORi Reduktionsschema	CyA / Tac Reduktionsschema
Tag 0,14,28,42,56: 5mg/kg Ab Tag 56: 5mg/kg alle 4 Wo	Baseline: 50-75% der Dosis Ab Tag 14: 25-50% der Dosis Nach 4 Wo: Absetzen	Baseline: 50% der Dosis Ab Tag 14: 25% der Dosis Nach 4 Wochen: Absetzen

CyA, Cyclosporin A; mTORi, mammalian target of rapamycin-Inhibitor; Tac, Tacrolimus; Wo, Wochen.

2.1.2 Patientenpopulation

Die vorliegende Studie wurde entsprechend den Vorgaben des Arzneimittelgesetzes unter der EudraCT-Nummer 2012-005652-42 registriert und sowohl vom Paul-Ehrlich-Institut (Vorlage-Nr.: 189/01), als auch von der zuständigen Ethikkommission des Landes Berlins (GeschZ: 13/0221 – EK 11) mit dem Prüfplancode IM103-319 und dem Titel "*Biomarker der humoralen Immunantwort nach Umstellung auf Belatacept im Vergleich zur konventionellen immunsuppressiven Therapie bei nierentransplantierten Patienten*" genehmigt. Alle Studienteilnehmer gaben nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung und Beantwortung aller offener Fragen zum Studienvorhaben ihr schriftliches Einverständnis. Einschlusskriterien waren wie folgt: Alter von ≥ 18 Jahren, eine ≥ 3 Monate zurückliegende Nierentransplantation unter CNI- oder mTORi-Immunsuppression mit MPA als Begleitmedikation, eine Erst- oder Zweittransplantation von lebenden oder verstorbenen Spendern mit kompatibler Blutgruppe. Zudem waren ein Serumkreatininwert < 4 mg/dl und $< 30\%$ Panel reactive antibodies (PRA) vor Transplantation Einschlusskriterium. Frauen im gebärfähigen Alter mussten einen negativen Schwangerschaftstest aufweisen und über die Dauer der Therapie zwei adäquate Methoden der Empfängnisverhütung durchführen. Jedem auf Belatacept umgestellten Patienten wurde ein passender Kontrollpatient zugeordnet. Geschlecht, Ausgangsmedikation, Alter (± 10 Jahre), Nierenfunktion (Kreatinin ± 1.5 mg/dl) und Transplantationsdauer (± 5 Jahre) mussten mit dem jeweiligen auf Belatacept umgestellten Patienten übereinstimmen. Die Gruppeneinteilung ist in **Tabelle 3** dargestellt. Laborwerte, Transplantations- und Krankenhausdaten wurden der Datenbank "Tbase2"⁹² entnommen.

Tabelle 3. Gruppeneinteilung der Studienpatienten.

Gruppenname	B1	B2	K1	K2
	Belataceptgruppe 1	Belataceptgruppe 2	Kontrollgruppe 1	Kontrollgruppe 2
Medikation	CNI Umstellung auf Belatacept	mTORi Umstellung auf Belatacept	CNI	mTORi
Patienten, n	10	9	10	9

CNI, Calcineurin-Inhibitor; mTORi, mammalian target of rapamycin-Inhibitor.

2.2 Materialien

2.2.1 Probenmaterial

Im Rahmen der ambulanten Betreuung oder eines stationären Aufenthaltes wurden den Patienten am jeweiligen Untersuchungstag zusätzlich zu der regulären Blutentnahme Blut für die Untersuchungen der Studie entnommen. Dabei handelte es sich um drei 10ml Lithium-Heparin-Röhrchen sowie ein 6ml EDTA-Röhrchen Blut. Von jedem Untersuchungszeitpunkt wurden pro Patient jeweils vier 500µl Röhrchen Plasma nach Zentrifugation bei 3000 x g und 4°C über 5 min bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Labormaterial

Die verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4. Laborgeräte.

Laborgerät	Hersteller
Sterile Arbeitsbank Laminair HB 2248	Holten, Branneburg, DE
Einstellbare Pipette, 2.5µl / 10µl / 100µl / 200µl / 1ml	Eppendorf-Research, Hamburg, DE
Multikanalpipette (S-12; 30-300µl)	Brand Tech, Essex, UK
Dispensierpipette (Multipette plus, 50-100µl)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Electrical pipetting, Accu-Jet	Sigma – Aldrich, Taufkirchen, DE
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus, Hanau, DE
Absaugpumpe (SUE 30)	Heto Lab Equipment, Allerød, DNK
Vortexer (MS2 Minishaker)	Janke & Kunkel IKA, Staufen, DE
-80° Gefrierschrank	REVCO, NL
-20° Kühlschranks	Liebherr, Biberach an der Riß, DE
Mikroskop DM IL	Leica, Wetzlar, DE
Zählkammer Neubauer- Improved	Laboroptik, Lancing, UK
FACS Canto II mit 405nm, 488nm, 632nm Argon	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, DE
Photometer – ELISA Reader (DTX 800 Multimode)	Beckmann Coulter, Krefeld, DE

Die verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Programme sind in den Tabellen 5 und 6 dargestellt.

Tabelle 5. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Artikel	Hersteller
Vacutainer Plasma-Blutentnahmeröhrchen Li-Heparin, 10ml	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Vacutainer EDTA-Blutentnahmeröhrchen, 6ml	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Plastikpipettierspitzen (10-5000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Einmal-Pasteurpipetten (3ml)	VWR Roth, Karlsruhe, DE
Einmal-Pipetten (10ml, 25ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Falcon-Röhrchen (15ml, 30ml, 50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5-2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
FACS-Röhrchen, Polystyrene (5ml)	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare, Solingen, DE
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Life Technologies, Gibco, Carlsbad, USA
Becton Dickinson Lysing Solution	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA
Platinum ELISA-KIT Human IL-17A/ BMS2017	Affymetrix/eBioscience, Frankfurt, DE

Tabelle 6. Software.

Programm	Hersteller
Becton Dickinson FACSDiva 8	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA
Office Excel Version 16	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Numbers Version 5 für MacOS	Apple Inc., Cupertino, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Multimode Software 3.2	Beckman Coulter, Brea, USA
Transplantationsdatenbank "TBase 2" ⁹²	Charité Universitätsmedizin, Berlin, DE

Die bei den FACS-Analysen eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7. Antikörper.

Antigen	Klon	Spezies und Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD127	eBioRDR5	Mouse IgG1, κ	APC	eBioscience™
CD194 (CCR4)	205410R	Mouse IgG2b, κ	Alexa Fluor 405	R&D Systems
CD196 (CCR6)	11A9	Mouse IgG1, κ	PE-Cy™7	BD, Pharmingen™
CD197 (CCR7)	2-L1-A	Mouse BALB/c IgG1, κ	PE	BD Pharmingen™
CD25	M-A251	Mouse BALB/c IgG1, κ	PE	BD Pharmingen™
CD28	CD28.2	Mouse C3H x BALB/c IgG1, κ	APC	BD Pharmingen™
CD3	UCHT1	Mouse BALB/c IgG1, κ	V450	BD Pharmingen™
CD38	HIT2	Mouse IgG1, κ	APC	BD Pharmingen™
CD38	HIT2	Mouse IgG1, κ	FITC	BD Pharmingen™
CD4	RPA-T4	Mouse Clone RPA-T4	PerCP-Cy™5.5	BD Pharmingen™
CD45RA	HI100	Mouse IgG2b, κ	PE-Cy™7	BD Pharmingen™
CD45RO	UCHL1	Mouse IgG2a, κ	APC-Cy7	Biolegend
CD57	HNK-1	Mouse IgM, κ	FITC	BD Pharmingen™
CD8	SK1	Mouse BALB/c IgG1, κ	APC-H7	BD Pharmingen™
CXCR3	49801	Mouse IgG1, κ	PE	R&D Systems
HLA-DR	G46-6	Mouse IgG2a, κ	V500	BD Pharmingen™

Angegeben ist jeweils das Antigen, gegen das der Antikörper (AK) gerichtet ist und die Klonnummer, welche anzeigt aus welchem Hybridom der AK stammt. Spezies und Isotyp benennen Quelle und AK-Isotyp. Das Fluorochrom ist der jeweils an den AK gekoppelte Farbstoff. Hersteller: BD Pharmingen, Heidelberg, DE; Biolegend, Koblenz, DE; eBioscience, Frankfurt, DE; R&D Systems, Wiesbaden, DE. Abkürzungen: s. Abkürzungsverzeichnis

2.3 Methoden

2.3.1 Fluoreszenz Durchflusszytometrie

2.3.1.1 Methode und Prinzip

Die Durchflusszytometrie, auf Englisch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) genannt, ermöglicht entsprechend ihrer Bezeichnung eine Sortierung und Messung von Zellen durch die optische Detektion von intra- und extrazellulären Molekülen.

Als einfache Durchflusszytometrie wird eine labormedizinische Methode bezeichnet, bei der die zu untersuchenden Zellen durch eine Messkammer fließen und aufgrund ihrer Größe und Struktur im Zytoplasma in unterschiedliche Zelltypen unterschieden werden. Dafür werden die Zellen in ihrer Trägerflüssigkeit beschleunigt und der Strahl so verjüngt (hydrodynamische Fokussierung), dass die Zellen jeweils einzeln hintereinander den Messlaser passieren. Der monochromatische Laserstrahl trifft auf die Einzelzelle, wird aufgrund der physikalischen Zell-Eigenschaften mit unterschiedlicher Qualität und Quantität gestreut und anschließend von Detektoren gemessen. Dabei gibt das

Vorwärtsstreulicht (FSC) Informationen über die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (SSC) über die Granularität und interne Komplexität.

Bei der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie werden bestimmte Oberflächenantigene der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gekennzeichnet und die durch das Laserlicht angeregte Fluoreszenz jedes Partikels gemessen. Mit einem bestimmten Laser kann man dabei nur Fluorochrome anregen, die in dem zugehörigen Wellenlängenbereich eine gute Absorption zeigen. Mit einem Argon-Laser (488nm) lassen sich zum Beispiel die Farbstoffe Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridinin-Chlorophyll (PerCP) anregen, die dann grünes, oranges oder rotes Licht emittieren. Eine andere Wellenlänge (632nm) hingegen kann z.B. zur Anregung von Allophycocyanin (APC) verwendet werden. Zusätzlich können sogenannte Tandemkonjugate wie PerCP/Cy5.5, PE/Cy7 und APC/Cy7 eingesetzt werden. Das bedeutet, dass der erste Farbstoff durch den Laser angeregt wird und als Energiedonor für den zweiten Farbstoff (Cyanin 5 oder Cyanin 7) dient. Dieser Energietransfer wird auch als Energieresonanztransfer bezeichnet. Der zweite Farbstoff gibt dann die Energie, die er vom ersten Farbstoff erhalten hat, als langwelligeres Licht ab. Dabei können unterschiedliche Laser und Detektoren im Zusammenspiel mit Filtern und Verstärkern angewandt werden, um möglichst viele Oberflächenantigene gleichzeitig detektieren zu können. Die Oberflächenantigene werden mit Hilfe der CD "Cluster of Differentiation" - Nomenklatur eingeteilt, einer Klassifikation bestimmter Moleküle auf der Oberfläche von Leukozyten, die mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern detektiert werden können⁹³.

Nicht nur der qualitative Nachweis eines Oberflächenantigens, sondern auch seine quantitative Bestimmung über die Fluoreszenzintensität ist möglich. Jedes optische Signal, welches von einem Detektor erfasst wird, wird in einen elektrischen Impuls umgewandelt, computergestützt analysiert und in einem Dot-Plot (Punktwolkendarstellung) zweidimensional dargestellt. Mit Hilfe der Auswertungssoftware können die positiv gefärbten Zellen nach ihren Oberflächenmolekülen sortiert, in bestimmte Zellpopulationen zusammengefasst und ausgezählt werden.

2.3.1.2 Durchführung

Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Zu den Messzeitpunkten wurde jedem Patienten 30ml Blut in Lithium-Heparin-Vacutainer abgenommen. Je 10ml wurden in drei Falcon-Röhrchen aufgeteilt und mit PBS auf 35ml aufgefüllt. Die PBMCs wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mit 15ml Ficoll-Paque™ PLUS bei 1000 x g und 22°C für 20min von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Unter der Zentrifugation trennten sich vier Phasen des Blutes. Am Boden des Falcons bildete sich ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten, welches durch die Ficollschicht von einem Ring von Monozyten und Lymphozyten (mononukleäre Zellen) getrennt wurde. Auf diesem befand sich als oberste Schicht das Plasma mit den Thrombozyten.

Der weiße Ring aus mononukleären Zellen wurde mithilfe einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und in vier 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Diese wurden mit PBS auf 12ml aufgefüllt und bei 1200 x g bei 4°C für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und die entstandenen vier Pellets in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und mit 12ml PBS suspendiert. Jeweils 10µl dieser Zellsuspension wurden mit Hilfe einer Neubauer-Improved-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt und daraufhin erneut bei 1000 x g für 10min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen entsprechend der Zielzellzahl in FACS Puffer für die Biomarkerfärbung gelöst, bei der T-Zellfärbung in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen in 20µl FACS-Puffer.

Biomarkerfärbung der PBMCs

Bei der Wahl der Antikörper für die FACS-Messung orientierten wir uns an dem "Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project" von Maecker *et al.*³¹ (**siehe Abbildung 6**). Aufgrund der begrenzten Anzahl von Detektoren im Cytometer teilten wir die jeweiligen Antikörper auf drei verschiedene Färbungen mit maximal acht Fluoreszenzen, wie von Maecker *et al.*³¹ vorgeschlagen, auf. Die Farben wurden entsprechend des Gating-Schemas (**Abbildung 6**) aufgeteilt. Die Färbung "T-Zellen" (**Tabelle 8a**) enthält alle Biomarker für die Identifizierung von CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen sowie ihrer Subpopulationen. Für Th17- sowie Th1- und Th2- Zellen und deren Untergruppen wurde die Färbung "Th17/Th1/Th2" (**Tabelle 8b**) verwendet. Die Färbung "Treg" (**Tabelle 8c**) enthält alle Antikörper für die Markierung der T-regulatorischen Zellen sowie deren funktionelle Untergruppen.

Die Antikörper wurden für die jeweilige Färbung entsprechend spezifischer Pipettierschemas (**Tabellen 8a-c**) in die Reagenzgläser zu jeweils 100µl PBMCs pipettiert und dann 30min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 500µl Lysing Solution (350µl BD Lysing Solution in 3150µl H₂O gelöst) pro Tube und 15min Inkubation bei Raumtemperatur. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 300 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 150µl FACS Puffer gelöst. Bis zur Messung wurden die Reagenzgläser kühl und dunkel gelagert.

Pipettierschema T-Zellfärbung

Tabelle 8a. Antikörper-Färbung T-Zellen.

Antikörper	CD3	CD4	HLA-DR	CD8	CD45RA	CD197	CD38
Fluoreszenz-Farbstoff	V450	PerCP/Cy5.5	V500	APC/H7	PE/Cy7	PE	APC
Menge (µl)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	5,00	5,00

Tabelle 8b. Antikörper-Färbung Th17/Th1/Th2.

Antikörper	CD3	CD4	HLA-DR	CD8	CD196	CD38	CD194	CXCR3
Fluoreszenz-Farbstoff	V450	PerCP/Cy5.5	V500	APC/H7	PE/CY7	FITC	Alexa Fluor 405	PE
Menge (µl)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	5,00	5,00

Tabelle 8c. Antikörper-Färbung Treg (T-regulatorische Zellen).

Antikörper	CD3	CD4	HLA-DR	CD25	CD45RA	CD127	CD194
Fluoreszenz-Farbstoff	V450	PerCP/Cy5.5	V500	PE	APC/H7	APC	PE/CY7
Menge (µl)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	5,00

FACS Messung

Die gefärbten Zellen wurden unverzüglich mit dem Canto II Durchflusszytometer gemessen und mit der Becton Dickinson FACSDiva 8 Software qualitativ und quantitativ dargestellt. Pro Röhrchen mussten mindestens 100 000 Zellen gemessen werden, um in die Auswertung eingeschlossen zu werden. Proben mit weniger als 100 000 Zellen wurden nicht ausgewertet.

FACS Auswertung

Die Messung und graphische Darstellung der T-Zellpopulationen erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware FACSDiva 8 von Becton Dickinson. Für die exakte Darstellung und Zählung der markierten Zellen wurden als Referenz sogenannte FMO-Kontrollen (Fluorescence Minus One) durchgeführt. Diese Negativkontrollen sind für die Kalibrierung der Gates (Rahmen) notwendig, um Zellen mit ähnlichen Fluoreszenzen unterscheiden zu können. Die Gates wurden bei jeder Messung individuell angepasst. Bezüglich der Darstellung entschieden wir uns für Punktediagramme und Histogramme. Bei den Punktediagrammen wurden immer zwei verschiedene Farbstoffe gegeneinander abgegrenzt. Auf der x- sowie auf der y-Achse nimmt dabei die Fluoreszenzintensität nach rechts bzw. oben zu. So können durch die Voreinstellung der Gates mithilfe der FMOs für die jeweiligen Farbstoffe positive und negative Zellpopulationen unterschieden werden (Zweifarbfluoreszenz). Bei den Histogrammen wird eine vorher definierte Zellpopulation anhand ihrer Fluoreszenzintensität für einen ausgewählten Farbstoff dargestellt (Einfarbfluoreszenz). Die x-Achse spiegelt dabei die Fluoreszenzintensität und die y-Achse die Zellzahl wider. Auch hier wurde ein positives oder negatives Gate zur Zählung der Zell-Subpopulationen erstellt.

Am Beginn jeder T-Zell Auswertung mit der FACS-Technologie steht die Identifizierung der Lymphozyten-Population. Dies kann mit Hilfe des Streulichtdetektors noch ohne Fluoreszenz-Analyse geschehen. Der Forward Scatter Detektor (FSC) misst dabei das Licht, das von der Zelle in derselben Achse wie der Laserstrahl gestreut wird, der Side Scatter Detektor (SSC) misst das Streulicht, das im 90° Winkel abgelenkt wird. Der FSC entsteht durch Beugung des Lichts an der Zelloberfläche, während der SSC durch Beugung an Membranen und Vesikeln im Zellinneren entsteht. So kann anhand des ersten Dotplots (SSC gegen FSC) die Lymphozyten-Population anhand ihrer Größe und Granularität mit einem Gate eingegrenzt werden. Zelltrümmer sowie tote Zellen und Zellaggregate werden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, da sie sich nicht in dem ersten Gate befinden. Alle Gates einer Auswertung sind miteinander verknüpft und wirken so wie in Reihe geschaltete Filter bei der weiteren Selektion. Anschließend werden die Populationen anhand von positiven und negativen Fluoreszenzparametern identifiziert. Die drei Färbungen wurden anhand der Einteilung der T-Zellen mit Hilfe von Biomarkern (**Abbildung 6**) mit drei verschiedenen Gating-Strategien ausgewertet. Punktediagramme wurden zur Darstellung gewählt, wenn mehr als ein Antikörper für die Identifizierung der Population notwendig war, Histogramme kamen bei der Betrachtung

einer Population im Hinblick auf nur einen Antikörper zur Anwendung. **Abbildung 7** zeigt exemplarisch die Gating-Strategie der T-Zell-Färbung, **Abbildung 8** die Auswertung der Th17/Th1/Th2- Zellen und **Abbildung 9** die verwendeten Gates für die Treg- Analyse.

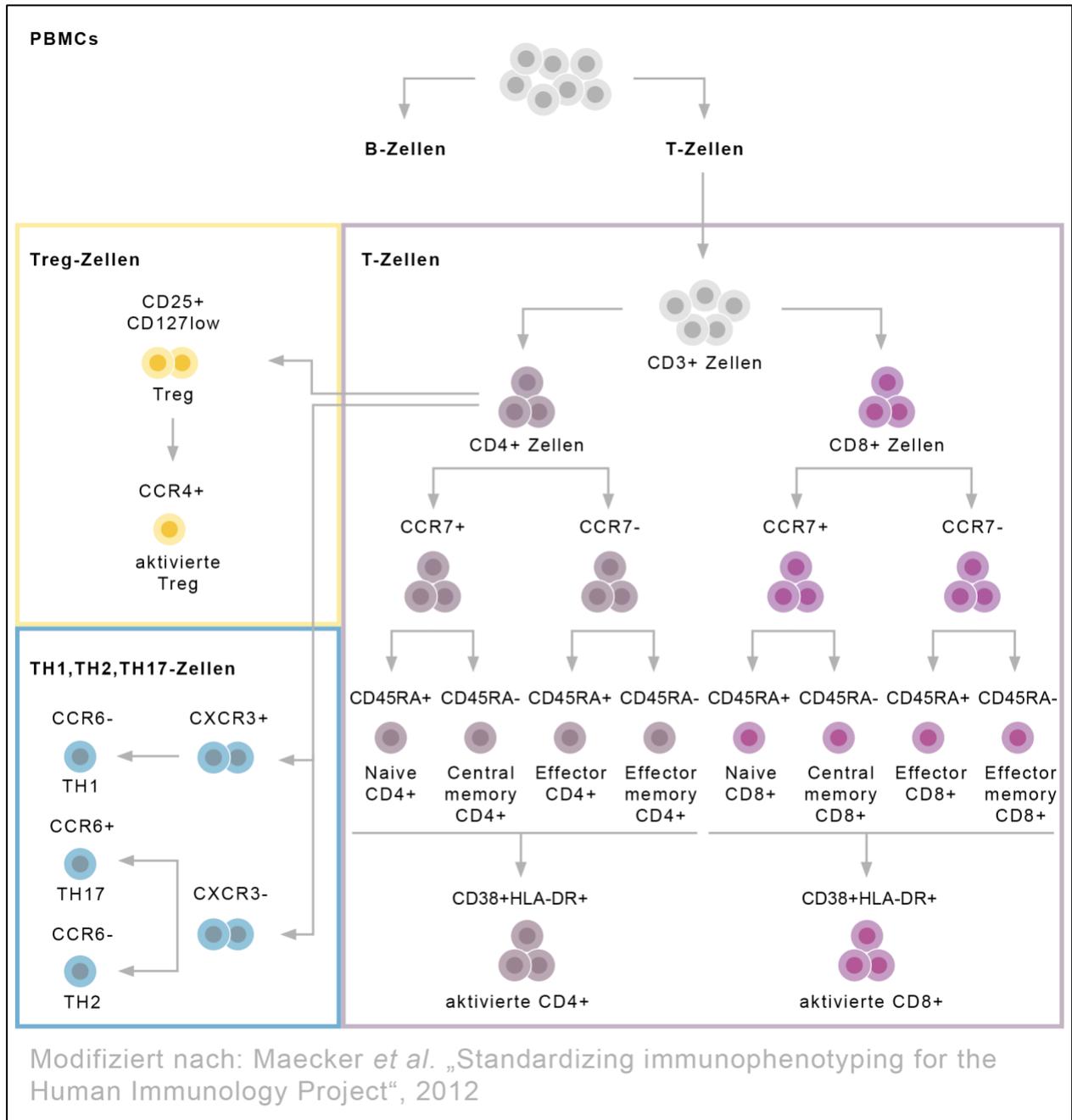


Abbildung 6. Übersicht über die Einteilung der T-Zellen mit Hilfe von Biomarkern. Die Grafik zeigt schematisch die Differenzierung der T-Zellen in funktionelle Untergruppen anhand von durchflusszytometrisch bestimmbarer Antikörpern, welche charakteristisch für die unterschiedlichen T-Zellpopulationen sind. Farbig umrahmt sind jeweils die drei Biomarkerfärbungen dieser Studie. PBMC, Peripheral blood mononuclear cells. Modifiziert nach³¹.

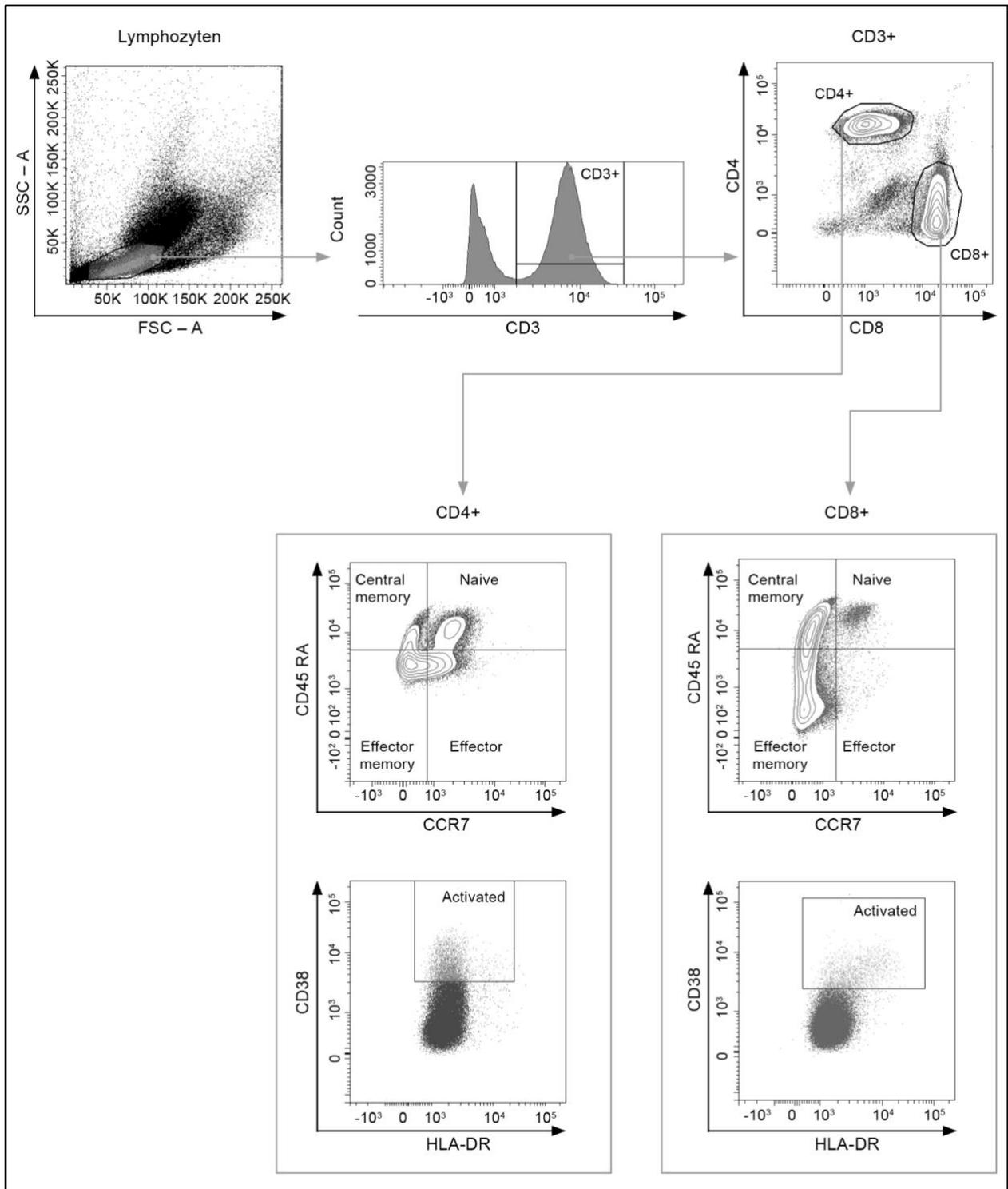


Abbildung 7. Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Auswertung der T-Zellfärbung. Schematische Darstellung zur Abgrenzung der CD3-positiven Subpopulationen CD4 und CD8 sowie von deren Untergruppen anhand von Streudiagrammen und Histogrammen der Antikörper-Fluoreszenzen. Die Gates umrahmen jeweils die Zellpopulation und zeigen mit einem Pfeil die weitere Selektion dieser Untergruppe mit Hilfe von Antikörpern an. x- und y-Achse sind mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC) sowie den jeweiligen fluoreszierenden Antikörpern beschriftet.

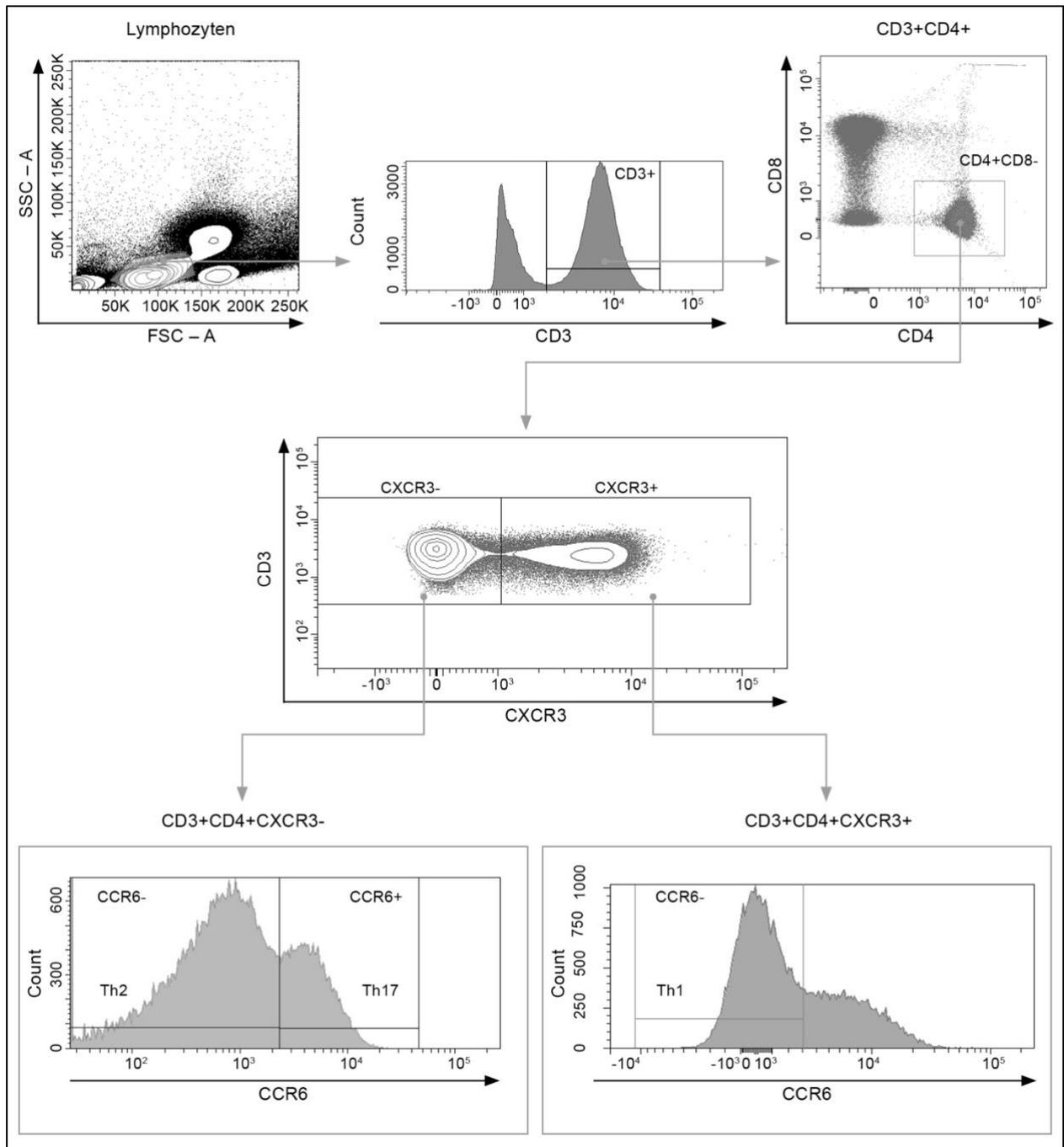


Abbildung 8. Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse der Th17/Th1/Th2-Zellfärbung. Schematische Darstellung zur Abgrenzung der CD3+CD4+Subpopulationen anhand von Streudiagrammen und Histogrammen der Antikörper-Fluoreszenzen. Die Gates umrahmen jeweils die Zellpopulation und zeigen mit einem Pfeil die weitere Selektion dieser Untergruppe mit Hilfe von Antikörpern an. x- und y-Achse sind mit dem Vorwärtstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC) sowie den jeweiligen fluoreszierenden Antikörpern beschriftet.

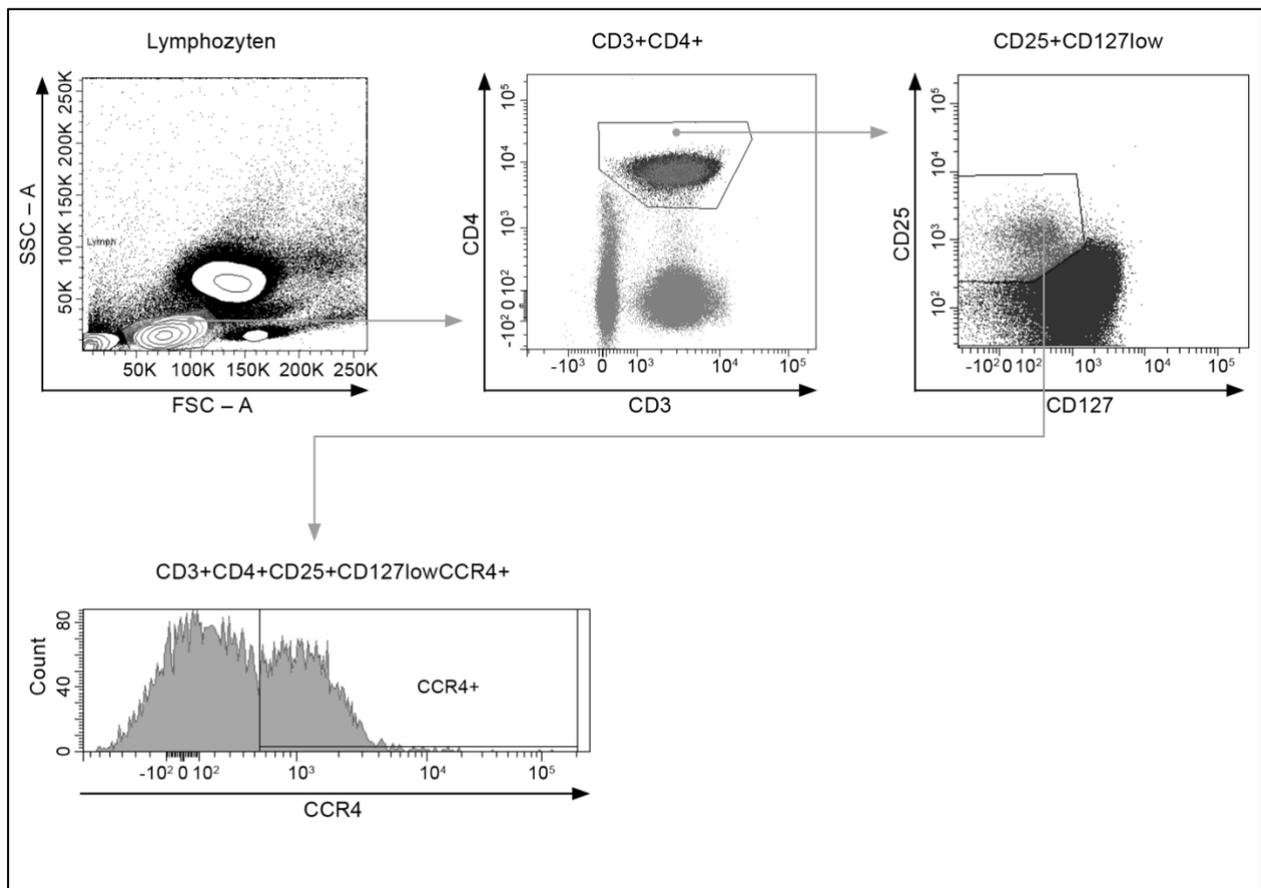


Abbildung 9. Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse der Treg Zellfärbung. Schematische Darstellung zur Abgrenzung der T-regulatorischen Zellen sowie ihrer Subpopulationen anhand von Streudiagrammen und Histogrammen der Antikörper-Fluoreszenzen. Die Gates umrahmen jeweils die Zellpopulation und zeigen mit einem Pfeil die weitere Selektion dieser Untergruppe mit Hilfe von Antikörpern an. x- und y-Achse sind mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC) sowie den jeweiligen fluoreszierenden Antikörpern beschriftet.

Die Ergebnisse der Messungen wurden als erfasste Zellen (Event), prozentualer Anteil der zuvor definierten Gates (Parent %, Grandparent %) und prozentualer Anteil aller erfassten Zellen (Total %) dokumentiert. Die erhobenen Zellzahlen wurden auf die korrekte Färbung hin mithilfe der Batch-Analyse kontrolliert und bei Färbefehlern wegen etwaiger Folgefehler aus der Auswertung ausgeschlossen.

Für die Auswertung berechneten wir die absoluten Zellzahlen mithilfe der Lymphozytenzahl des jeweiligen Patienten am entsprechenden Messtag. Dieser Wert (Lymphozyten/nl) wurde der Transplantationsdatenbank "Tbase2" entnommen. Die Berechnung der absoluten Zellzahl erfolgte mit folgender Formel:

$$\frac{\left(\frac{\text{Lymphozyten}}{\text{nl}} \times \text{Zellzahl in \% der Lymphozyten} \times 1000 \right)}{100} = \text{Anzahl der Zellen je } \mu\text{l Blut}$$

2.3.2 ELISA

2.3.2.1 Methode und Prinzip

Zur Analyse der Konzentration von IL-17A im Plasma der Studienpatienten wurde das Sandwich-ELISA-Verfahren (Enzyme-linked immunosorbent assay) angewandt. Dabei handelt es sich um ein immunologisches Verfahren, bei dem das gesuchte Antigen an einen Antikörper gekoppelt wird, welcher über eine enzymatische Reaktion eine photometrisch erfassbare Farbreaktion hervorruft. Diese ist mittels spektrophotometrischer Messung detektierbar. Anhand einer Kalibrierungskurve, welche durch eine Standard-Verdünnungsreihe erstellt wird, kann die Konzentration des nachzuweisenden Antigens errechnet werden.

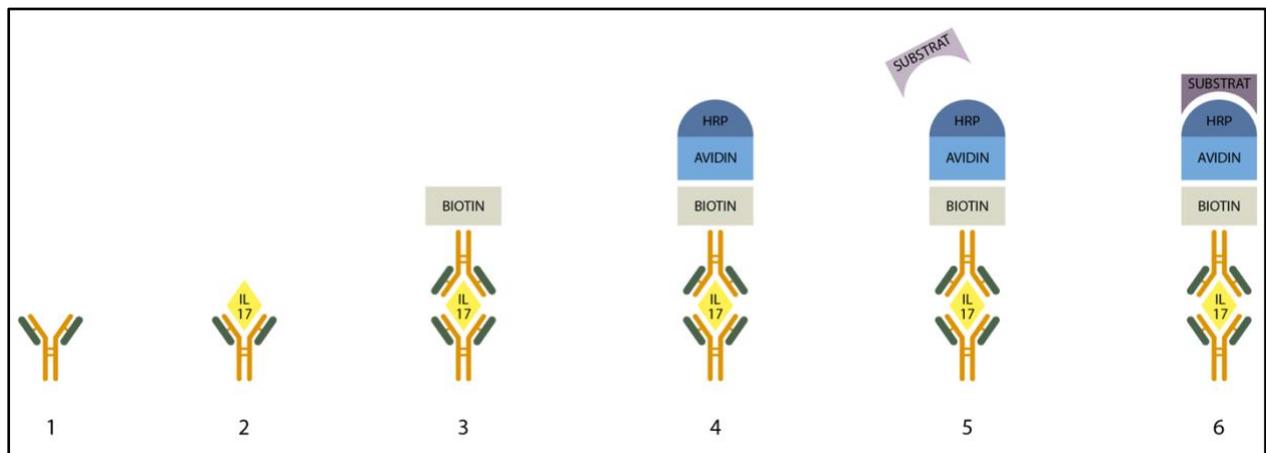


Abbildung 10. Schematischer Aufbau ELISA. **1.** Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Wells) sind mit einem Antigen-spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet. **2.** Das Probenmaterial wird hinzugegeben. Das Antigen (hier IL-17A) bindet an den spezifischen Antikörper. **3.** Der Biotin-gekoppelte polyklonale anti-IL-17A Antikörper wird dazu gegeben, der ebenfalls an das IL-17A-Molekül bindet. Die Platten werden für 2h inkubiert. **4.** Nach einem vierfachen Waschschrift wird Streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase) hinzugefügt, die an Biotin bindet. Erneut wird die Platte für 1h inkubiert. **5.** Nach viermaligen Waschen wird eine Substratmischung (Tetramethylbenzidin) zugegeben und 10 Minuten inkubiert. Durch das Enzym HRP wird ein Farbumschlag ausgelöst. **6.** Der Farbumschlag wird durch die Zugabe von Säure gestoppt und die Farbintensität bei 450nm gemessen.

2.3.2.2 Durchführung

Zur Ermittlung der IL-17A-Konzentration im Plasma der Patienten wurden drei ELISA-Kits Human IL-17A der Firma eBioscience verwendet. Wir untersuchten die Proben zum Baseline-Zeitpunkt, sowie drei und sechs Monate nach der Umstellung auf Belatacept, um die frühe Entwicklung des hauptsächlich von den Th17-Zellen produzierten Zytokins zu untersuchen. Dafür wurde das in dem Kit enthaltene humane IL-17A Standard-Protein in 800µl destilliertem Wasser gelöst, um eine den Herstellerangaben entsprechende Ausgangskonzentration von 200pg/ml zu erreichen. Es folgte eine 1:2 Verdünnung des

Standards in sieben Schritten mit dem mitgelieferten "Sample Diluent". Bei der Standard-Erstellung kam es somit im höchstkonzentrierten Standard zu einer Konzentration von 100pg/ml und in der geringsten Konzentration 1,6pg/ml humanem IL-17A Standard-Protein. Als Negativ-Kontrolle wurde die Extinktion der Verdünnungslösung (Sample Diluent) gemessen. Die Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen waren mit einem monoklonalen anti-IL-17A Antikörper vorbeschichtet und wurden in einem ersten Waschschrift mit Waschpuffer gespült, wobei unspezifische Bindungsstellen durch das Detergenz Tween 20 (1% im Waschpuffer enthalten) verhindert wurden. Die Plasmaproben wurden seit der Blutentnahme bei -80°C gelagert, langsam bei Raumtemperatur aufgetaut und dann 50µl Probe zusammen mit 50µl "Sample Diluent" pro Well pipettiert. Die Verdünnungsreihe des Standards sowie die gemessenen Proben wurden jeweils im Doppelansatz gemessen. Der Ablauf des ELISA-Tests ist in **Abbildung 10** beschrieben. Nach dem Stoppen des Farbumschlags wurde die Extinktion im Spektralphotometer DTX 800 von Beckmann Coulter bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Durch die Messung der Extinktion der Standard-Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt, auf der jede gemessene Absorption einer IL-17A-Konzentration zuzuordnen ist. Die Blankwerte (Negativkontrolle) wurden von den Messwerten abgezogen. Die IL-17A Konzentrationen der Patientenproben wurde mit der GraphPad Prism Software errechnet.

2.3.3 Klinische Parameter

Für die Funktionskontrolle des Nierentransplantats im Verlauf der Studie wurden zwei Parameter herangezogen. Zum einen wurde die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bestimmt. Für deren Berechnung wurde die Chronic-Kidney-Disease-Epidemiology-Collaboration (CKD-EPI) -Formel nach Levey *et al.*⁹⁴ angewandt, mit deren Hilfe aus Serumkreatinin, Alter, Geschlecht und Hautfarbe die GFR errechnet werden kann. Zum anderen wurde die im Spontanurin gemessene Albuminurie als Albumin/Kreatinin-Quotient in mg/g Kreatinin erfasst. Die erforderlichen Laborwerte zu den jeweiligen Messpunkten, ebenso wie Daten zur Änderung der immunsuppressiven Medikation, zum Patienten- und Transplantatüberleben sowie zum Auftreten von Rejektionen wurden der Transplantationsdatenbank "Tbase2"⁹² entnommen.

2.3.4 Datenverwaltung und statistische Auswertung

Alle im Rahmen der Studie erhobenen Rohdaten sind auf dem Server des nephrologischen Forschungslabors der Charité Passwort-geschützt für zugangsberechtigte Angehörige der Charité abrufbar. Es erfolgte eine Anonymisierung der Patientennamen für die Datenverarbeitung und Auswertung. Für die vorliegende Arbeit wurden die Daten mit der Software Microsoft Excel für Mac Version 16.0 und dem Programm Numbers Version 5.0 verwaltet. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 8 für Mac.

Für den Vergleich von Werten unterschiedlicher Patientengruppen nutzten wir den nicht-parametrische Mann-Whitney *U*-Test. Beim Vergleich verschiedener Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Ein *p*-Wert <0,05 bei beidseitiger Testung wurde als signifikant bewertet.

Die Ergebnisse wurden als Median mit dem jeweiligen Interquartil-Range (IQR) angegeben. Dieser Range ist ein Maß für die statistische Streuung und entspricht der Differenz zwischen der 75. und 25. Perzentile.

Es erfolgte die graphische Darstellung der ermittelten Daten im Box-Plot-Format. Dieser Diagrammtyp umfasst fünf Kennwerte: die Box zeigt den Bereich in dem 50% der Daten (2. und 3. Quartil) liegen, der Balken innerhalb der Box zeigt den Median, die Antennen zeigen die außerhalb der Box liegenden Werte an. Entsprechend der Definition von John W. Tukey⁹⁵ sind die Längen der Antennen auf maximal das 1,5-fache des Interquartilen-Abstandes beschränkt. Ausreißer werden durch eine unabhängige Markierung im Diagramm angezeigt. Bei der Darstellung mehrerer Gruppen wurde zur Verbesserung der Übersicht teilweise nur der Median mit oder ohne IQR dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Probanden

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine explorative Interventionsstudie, die sich von November 2013 bis März 2016 erstreckte. Das Studiendesign war nicht-randomisiert, kontrolliert und prospektiv angelegt. Patienten des Interventionsarmes, die nach Transplantation Anzeichen einer Arzneimittelunverträglichkeit auf ihre immunsuppressive Therapie zeigten, wurden nach Aufklärung und Unterzeichnung der Einverständniserklärung auf Belatacept umgestellt. Zwischen der Nierentransplantation und der Baseline-Messung unserer Studie lagen bei den Studienpatienten im Durchschnitt 7,5 Jahre. Insgesamt wurden 10 Patienten mit einem CNI-basierten (Gruppe B1) und neun Patienten mit einem mTORi-basierten (Gruppe B2) Therapieregime schrittweise über vier Wochen auf den Ko-Stimulationsblocker umgestellt. Parallel wurden entsprechende Kontrollpatienten unter der Ausgangsmedikation (Gruppen K1 und K2) anhand der festgelegten Kriterien (s. Kapitel 2.1) identifiziert und in die Studie eingeschlossen. Wichtige Patientencharakteristika zum Baseline-Zeitpunkt sind in **Tabelle 9** dargestellt. Bei dem Vergleich der beiden Studiengruppen mit ihren jeweiligen Kontrollgruppen zeigte sich ein Unterschied im Bereich der eGFR zwischen der Studiengruppe B2 und Kontrollgruppe K2 (B2 vs. K2: $45,6 \pm 18,6$ ml/min vs. $69,1 \pm 13,7$ ml/min; $p=0,01$). Der Anteil an männlichen Patienten in der CNI-Studiengruppe (B1) lag mit 90% (9/10) im Vergleich zur mTORi-Studiengruppe (B2) mit 44% (4/9) deutlich höher (B1 vs. B2: $p=0,01$). Zum Baseline-Zeitpunkt lag die Transplantation in der B1-Gruppe im Durchschnitt 6 Jahre zurück, in der B2-Gruppe 9,5 Jahre.

In **Tabelle 10** sind die Grunderkrankungen, welche die Nierentransplantation erforderlich machten, aufgelistet. Betrachtet man die Ursachen für die Umstellung der Immunsuppression auf eine Ko-Stimulationsblockade näher, so war die CNI-Nephrotoxizität in Gruppe B1 der alleinige Umstellungsgrund. Bei der mTORi-Gruppe war die Pneumonitis in 4/9 (44%) Fällen die häufigste und wichtigste klinische Ursache für die Umstellung auf Belatacept. Bei allen Studienteilnehmern wurde neben der Studienmedikation MPA (CellCept® oder Myfortic®) verabreicht. Glucocorticoide wurden in 4/10 Patienten aus der Gruppe B1 und in 3/9 Patienten aus der Gruppe B2 fortgeführt (**siehe Tabelle 11**).

Tabelle 9. Charakterisierung der Studien- und Kontrollpatienten.

	B1	K1	p	B2	K2	p
Medikation	CNI ↓ Belatacept	CNI		mTORi ↓ Belatacept	mTORi	
Patienten, n	10	10		9	9	
Alter in Jahren, Mean ± SD	51,5 ± 11,6	50,2 ± 12,7	0,83	54,9 ± 21,1	55,4 ± 13,0	0,98
Männlich, n	9	9	>0,99	4	4	>0,99
eGFR in ml/min, Mean ± SD	33,1 ± 17,1	28,8 ± 9,6	0,17	45,6 ± 18,6	69,1 ± 13,7	0,01
1. Tx, n	8	10	0,47	9	8	>0,99
2. Tx, n	2	-	0,47	-	1	>0,99
Zeit Tx - BL in Jahren, Mean ± SD	6,1 ± 6,2	7,2 ± 5,2	0,67	9,4 ± 4,2	9,3 ± 4,6	>0,99

Sämtliche Daten wurden zum Studienbeginn (Baseline) erhoben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung (Mean ± SD). Unterschiede zwischen den Gruppen (p-Wert) wurden mithilfe des Mann-Whitney *U*-Tests ermittelt. BL, Baseline; CNI, Calcineurin-Inhibitor; mTORi, mammalian target of rapamycin-Inhibitor; Tx, Transplantation.

Tabelle 10. Grunderkrankungen der Studien- und Kontrollpatienten.

Grunderkrankung, n	B1	K1	B2	K2
Glomerulonephritis / Vaskulitis	2	3	3	1
ADPKD	4	1	2	2
Reflux-Nephropathie	2	-	1	1
Hypertensive Nephropathie	-	1	-	1
Diabetische Nephropathie	1	-	1	-
Interstitielle Nephritis	-	-	1	1
aHUS	-	-	1	-
Alport-Syndrom	-	1	-	-
Unbekannt	1	4	-	3

ADPKD, Autosomal Dominante Polyzystische Nierenerkrankung; aHUS, atypisches Hämolytisch-Urämisches Syndrom.

Tabelle 11. Immunsuppressive Zusatzmedikation der Studien- und Kontrollpatienten.

Zusatzmedikation, n	B1	K1	p	B2	K2	p
MMF-Äquivalent	10	10	>0,99	9	9	>0,99
Dosis 1000-1500mg	5	4	>0,99	7	3	0,15
Dosis 1501-2000mg	5	6	>0,99	2	6	0,15
Methylprednisolon	4	2	0,62	3	2	>0,9
Dosis 2mg	-	2	0,47	-	1	>0,9
Dosis 4mg	4	-	0,08	3	1	0,58
Vorausgegangene CNI - Therapie	-	-		9	8	>0,99

Dosis ist angegeben als MMF-Äquivalent: 360mg Myfortic-Dosis entsprechen 500mg CellCept bzw. MMF
CNI, Calcineurin-Inhibitor; MMF, Mycophenolatmofetil.

3.2 Patienten- und Transplantatüberleben

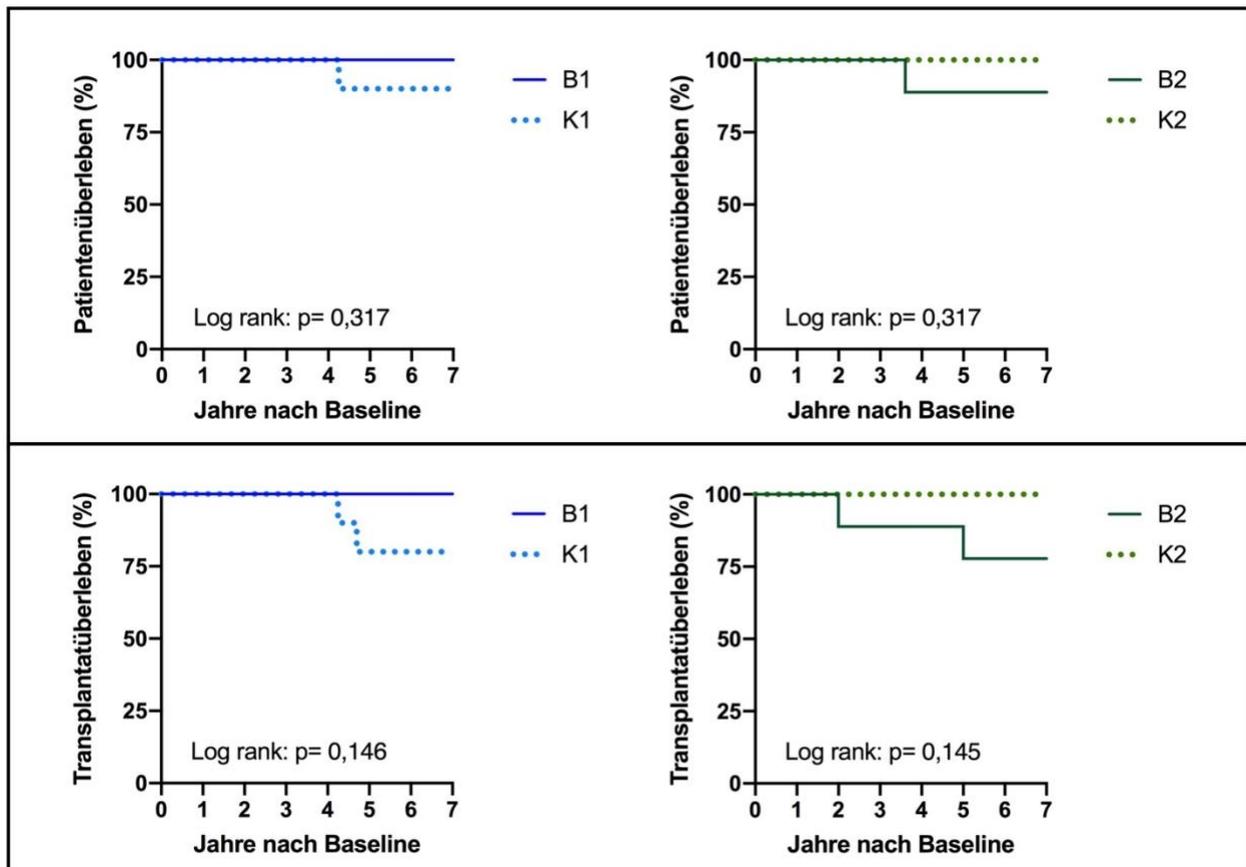


Abbildung 11. 7-Jahres-Patienten- und Transplantatüberleben. Abgebildet sind die auf Belatacept umgestellten Studiengruppen B1 und B2 sowie ihre korrespondierenden Kontrollgruppen K1 und K2 in der Kaplan-Meier-Analyse. Statistik: Log-Rank-Test für den Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen.

Das Patienten- und Transplantatüberleben wurden von der Baseline-Messung an, über den Ein-Jahres Studienzeitraum bis zu sieben Jahre nach Studieneinschluss erfasst. Im Studienzeitraum traten in allen vier Gruppen weder Todesfälle, Rejektionen noch Transplantatversagen auf. Im Verlauf der nächsten sechs Jahre zeigte sich in der CNI-Kontrollgruppe K1 ein Todesfall vier Jahre nach Baseline (BL), in Gruppe B1 überlebten alle Patienten (B1 vs. K1: 100% vs. 90%; $p=0,317$). In der Gruppe B2 verhielt es sich konträr: Ein Patient der Belatacept-Gruppe B2 verstarb drei Jahre nach BL, wohingegen in der mTORi-Kontrollgruppe K2 kein Todesfall auftrat (B2 vs. K2: 89% vs. 100%; $p=0,317$). Insgesamt wurde in allen Gruppen lediglich eine Rejektion in der Gruppe B1 28 Monate nach Baseline beobachtet. Bei Betrachtung des Tx-Überlebens zeigten sich in Gruppe B1 keine Tx-Verluste während in Gruppe K1 vier Jahre nach BL zwei Tx-Verluste auftraten (B1 vs. K1: 100% vs. 80%; $p=0,146$). In Gruppe B2 kam es nach Umstellung auf Belatacept zu zwei Tx-Verlusten während die Kontrollgruppe ohne Tx-Verluste blieb (B2 vs. K2: 78% vs. 100%; $p=0,145$).

3.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der T-Zellsubpopulationen

3.3.1 CD3+ Lymphozyten

Bei der ersten Analyse der Lymphozyten aus den PBMCs der Patienten wurden alle Zellen mit CD3-positiven Eigenschaften erfasst, um die Gesamtpopulation der T-Lymphozyten zu quantifizieren. Dabei wurde die Anzahl der CD3+ Lymphozyten in den Studiengruppen sowohl im Behandlungsverlauf nach 12 Monaten Belataceptgabe, als auch im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe untersucht. Die Anzahl der CD3-positiven Zellen blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum von der Baseline-Messung bis zum Monat 12 (M12) bei Gruppe B1 sowie bei Gruppe B2 unverändert. Auch der Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe erbrachte keine signifikanten Unterschiede, weder zu Beginn noch zum Ende der Studie (**siehe Tabelle 12**).

Tabelle 12. CD3+ T-Lymphozyten.

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1)		CNI (K1)	
	Median (IQR)	BL vs. M12 P-Wert (Wilcoxon-Test)	Median (IQR)	B1 vs. K1 P-Wert (Mann-Whitney U-Test)
Baseline (Zellen/ μ l)	1238 (615-1485)	0,375	1415 (850-1618)	0,360
M12 (Zellen/ μ l)	1088 (480-1474)		1161 (864-1520)	0,236
	Belatacept 2 (B2)		mTORi (K2)	
Baseline (Zellen/ μ l)	758 (679-1421)	0,910	722 (638- 996)	0,334
M12 (Zellen/ μ l)	1163 (585-1724)		1137 (726-1433)	0,888

3.3.2 CD3+CD4+ T-Zellen

Nach Identifizierung der CD3+ Zellen wurden die Lymphozyten im Hinblick auf CD4, den Marker für T-Helferzellen, untersucht. Der Anteil der CD3+CD4+ Zellen veränderte sich im Studienzeitraum bei den auf Belatacept umgestellten Patienten weder in Gruppe B1, noch in Gruppe B2. Bei dem Vergleich der Studienpatienten mit den jeweiligen Kontrollpatienten zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede, weder bei der Baseline-Messung noch ein Jahr nach Umstellung auf Belatacept (**siehe Tabelle 13**).

Tabelle 13. CD3+CD4+ T-Helferzellen.

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1)		CNI (K1)	
	Median (IQR)	BL vs. M12 P-Wert (Wilcoxon-Test)	Median (IQR)	B1 vs. K1 P-Wert (Mann-Whitney <i>U</i> -Test)
Baseline (Zellen/ μ l)	826 (497-1427)	0,469	981 (716-1347)	0,633
M12 (Zellen/ μ l)	873 (569-1139)		982 (678-1333)	0,730
	Belatacept 2 (B2)		mTORi (K2)	
Baseline (Zellen/ μ l)	656 (474-1022)	0,496	623 (530-892)	0,888
M12 (Zellen/ μ l)	669 (481-1143)		737 (577-1256)	0,743

3.3.2.1 CD4+ Subpopulationen

Die CD3+CD4+ T-Helferzellen wurden mit Hilfe der Biomarker CCR7 und CD45RA in vier funktionelle Subpopulationen unterteilt: Naive CD4+ Zellen (N=CD4+CCR7+CD45RA+), Central Memory CD4+ Zellen (CM=CD4+CCR7+CD45RA-), Effector CD4+ Zellen (E=CD4+CCR7-CD45RA+) und Effector Memory CD4+ Zellen (EM=CD4+CCR7-CD45RA-).

Bei der Baseline-Messung war die Anzahl der CD4+ EM-Zellen im Vergleich zu allen anderen Subpopulation am höchsten (B1: 835/ μ l (360-1203); B2: 705/ μ l (454-864)). Nach 12 Monaten Belatacept-Therapie sank die Zahl in Gruppe B1 signifikant ab (363/ μ l (150-605), $p=0,016$), während es in Gruppe B2 zu keinem signifikanten Abfall kam (672/ μ l (533-764), $p=0,590$). Im gleichen Zeitraum stieg die Anzahl der naiven CD4+ Zellen in Gruppe B1 (BL vs. M12: 198/ μ l (86-308) vs. 444/ μ l (288-752), $p=0,016$) an. Auch hier zeigte sich keine Veränderung in Gruppe B2 (BL vs. M12: 287/ μ l (111-692) vs. 346/ μ l (242-499), $p=0,910$). Bei den CD4+ Central Memory-Zellen und den CD4+ Effector-Zellen gab es in beiden Belatacept-Gruppen keine signifikanten Änderungen im Untersuchungszeitraum (**siehe Abbildung 12**). Der Vergleich der Studiengruppe und der Kontrollgruppe 12 Monate nach Konversion zeigte eine signifikant höhere Anzahl an CM-Zellen in Gruppe B2 im Gegensatz zu Gruppe K2 (B2 vs. K2: 248/ μ l (136-382) vs. 43/ μ l (15-115), $p=0,040$). In den anderen drei Subpopulationen, sowie bei dem Vergleich von B1 mit K1, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (**siehe Abbildung 12**).

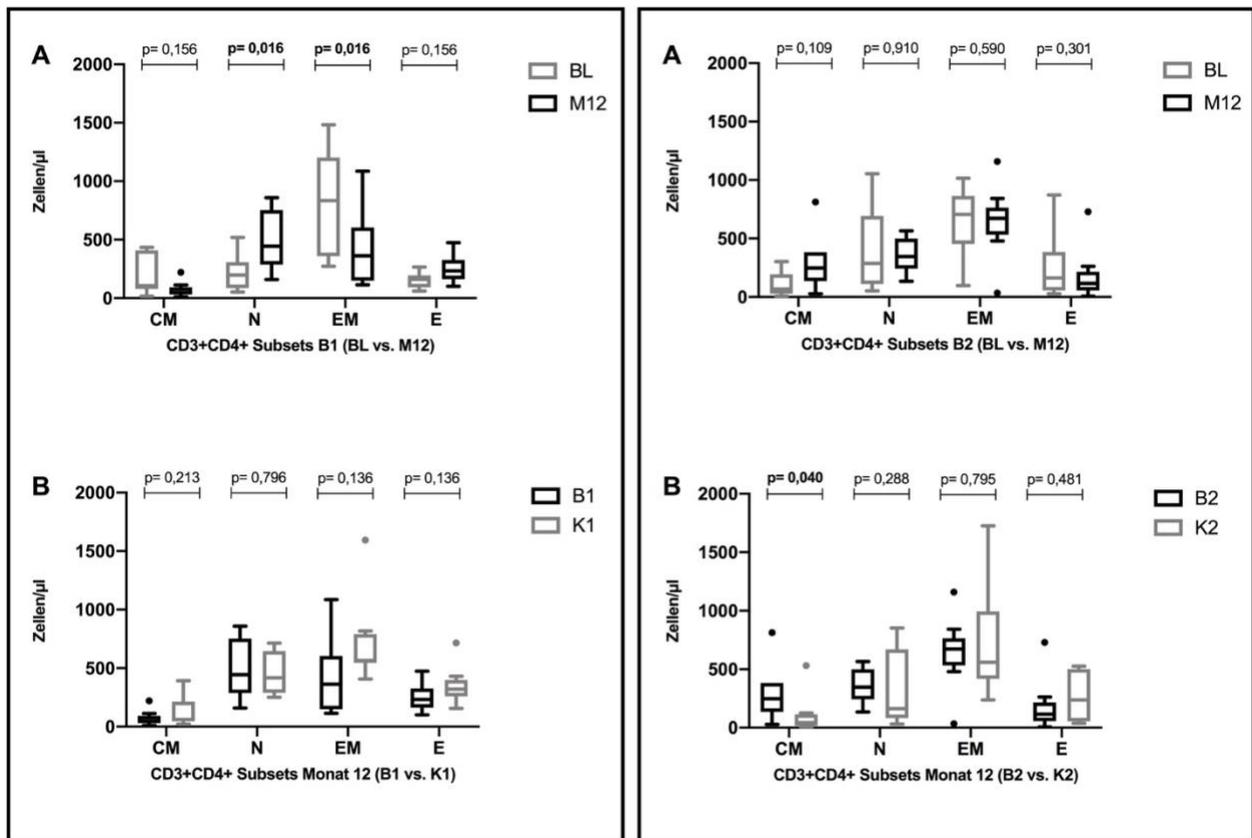


Abbildung 12. Analyse der CD3+CD4+ Subpopulationen. Darstellung der Zellzahl der CD4+ Subpopulationen pro µl als Boxplot: Central Memory (CM), Naive (N), Effector Memory (EM) und Effector (E) Zellen. Dargestellt sind die Werte zu Beginn der Studie (BL) und 12 Monate nach Umstellung auf Belatacept (M12) (A), sowie der Vergleich zwischen Studiengruppe (B1 bzw. B2) zur jeweiligen Kontrollgruppe (K1 bzw. K2) nach 12 Monaten (B). Statistik: Wilcoxon-Test für Vergleiche innerhalb einer Gruppe (A); Mann-Whitney U-Test für den Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Gruppen (B).

3.3.2.2 Aktivierte CD4+ Zellen

Um die Aktivierung der CD3+CD4+- Zellen zu untersuchen, wurden die CD38+HLA-DR+ Zellen der Studiengruppen zum Baseline-Zeitpunkt mit dem Monat 12 nach Beginn der Belatacept-Gabe verglichen. Unter dem Wechsel der Medikation ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der aktivierten CD4+ Zellen. Auch im Vergleich der Belatacept-Gruppen mit den jeweiligen Kontrollen zum Monat 12 der Studie kam es zu keinen signifikanten Differenzen (**siehe Tabelle 14**).

Tabelle 14. Aktivierte CD4+ T-Zellen

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1)		CNI (K1)	
	Median (IQR)	BL vs. M12 P-Wert (Wilcoxon-Test)	Median (IQR)	B1 vs. K1 P-Wert (Mann-Whitney U-Test)
Baseline (Zellen/ μ l)	46 (37-59)	0,813	63 (30-88)	0,744
M12 (Zellen/ μ l)	29 (3-212)		107(42-212)	0,387
	Belatacept 2 (B2)		mTORi (K2)	
Baseline (Zellen/ μ l)	77 (39-147)	0,547	71 (38-125)	0,907
M12 (Zellen/ μ l)	97 (33-135)		85 (28-221)	0,942

3.3.2.3 T-Helferzellen 1 (Th1)

Die Anzahl der CD3+CD4+CXCR3+CCR6- Zellen (Th1) nahm nach 12 Monaten in der von mTORi auf Belatacept umgestellten Gruppe (B2) im Vergleich zum Baseline-Wert signifikant ab (B2: BL vs. M12: 50/ μ l (20-58) vs. 29/ μ l (15-31), $p=0,039$). Auch in der von CNI auf Belatacept umgestellten Gruppe (B1) zeigte sich eine im Verlauf abnehmende Tendenz, die allerdings statistisch nicht signifikant war (B1: BL vs. M12: 70/ μ l (17-105) vs. 25/ μ l (10-88), $p=0,375$). Im Vergleich mit den Kontrollgruppen ergaben sich nach 12 Monaten keine signifikanten Unterschiede (siehe **Abbildung 13**).

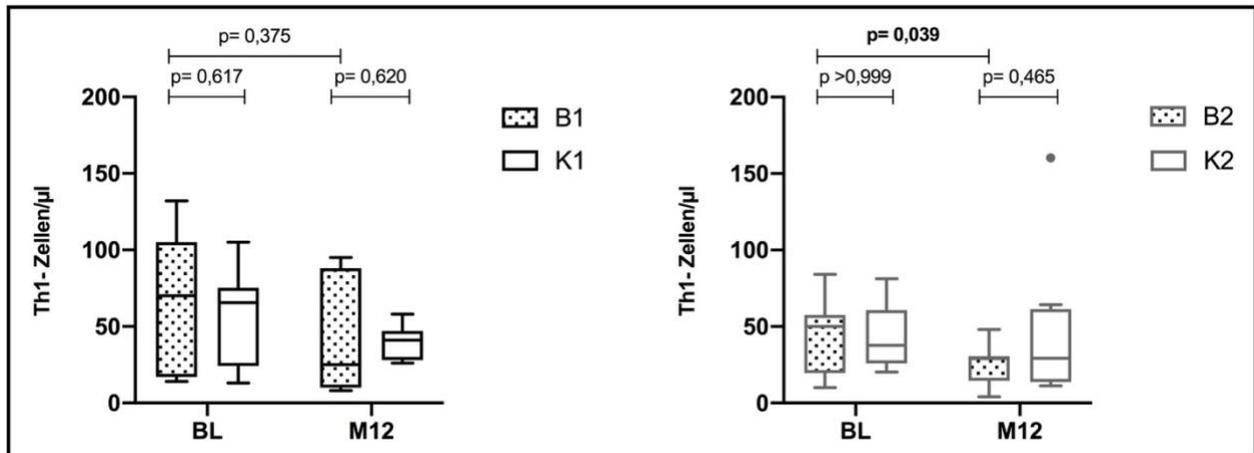


Abbildung 13. Analyse der Th1-Zellen. Anzahl der CXCR3+ und CCR6- CD3+CD4+ T- Zellen. Dargestellt sind die Werte der Gruppen B1 und B2 jeweils zum Baseline-Zeitpunkt (BL) und nach einem Jahr (M12), sowie im Vergleich die jeweilige Kontrollgruppe (K1 bzw. K2). Die Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Tests bei Vergleichen innerhalb einer Gruppe oder Mann-Whitney U-Test bei Vergleichen von zwei unterschiedlichen Gruppen.

3.3.2.4 T-Helferzellen 2 (Th2)

Der Anteil der CD3+CD4+CXCR3-CCR6- Zellen (Th2) blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum in allen untersuchten Gruppen konstant. Weder bei der Belatacept 1- noch bei der Belatacept 2-Studiengruppe konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Ausgangsmessung und Monat 12 nachgewiesen werden (B1, BL vs. M12: 264/ μ l (228-723) vs. 299/ μ l (200-529), $p > 0,999$; B2, BL vs. M12: 236/ μ l (137-519) vs. 153/ μ l (61-241), $p = 0,074$). Im Vergleich mit den Kontrollgruppen zeigten sich nach einem Jahr ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (**siehe Abbildung 14**).

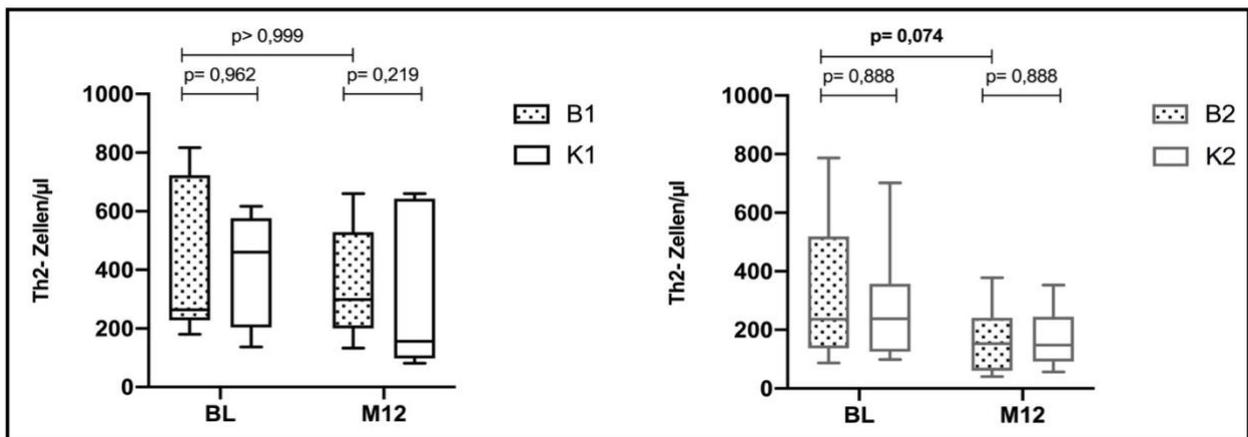


Abbildung 14. Analyse der Th2-Zellen. Anzahl der CXCR3- und CCR6- CD3+CD4+Zellen. Dargestellt sind die Gruppen B1 und B2 jeweils zum Baseline-Zeitpunkt (BL) und nach einem Jahr (M12) sowie im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (K1 bzw. K2). Die Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Test bei Vergleichen innerhalb einer Gruppe oder Mann-Whitney U-Test bei Vergleichen von zwei unterschiedlichen Gruppen.

3.3.2.5 Th1/Th2 Ratio

Das Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen, die Th1/Th2 Ratio, änderte sich im Verlauf der Studie (BL vs. M12) in keiner der beiden Studiengruppen. Der Vergleich mit den Kontrollpatienten ergab ebenfalls weder am Anfang (BL) noch am Ende der Studie (M12) signifikante Unterschiede (**siehe Tabelle 15**).

Tabelle 15. Th1/Th2 Ratio.

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1)		CNI (K1)	
	Median (IQR)	BL vs. M12 P-Wert (Wilcoxon-Test)	Median (IQR)	B1 vs. K1 P-Wert (Mann-Whitney U-Test)
Baseline (Ratio)	0,09 (0,08-0,27)	>0,999	0,12 (0,07-0,19)	0,943
M12 (Ratio)	0,08 (0,05-0,19)		0,19 (0,06-0,48)	0,299
	Belatacept 2 (B2)		mTORi (K2)	
Baseline (Ratio)	0,19 (0,07-0,34)	0,641	0,19 (0,10-0,43)	0,656
M12 (Ratio)	0,19 (0,10-0,30)		0,24 (0,08-0,48)	0,624

3.3.2.6 Th17 Zellen

Die Th17-Zellpopulation wurde mithilfe der Biomarker CXCR3 und CCR6 aus der CD3+CD4+- Elternpopulation identifiziert. Bei der Baseline-Messung lag das Niveau der Th17+ Zellen in Gruppe B1 (CNI) fast doppelt so hoch wie in Gruppe B2 (mTORi), allerdings war der Unterschied nicht signifikant (BL, B1 vs. B2: 67/ μ l (41-113) vs. 35/ μ l (28-65), $p=0,139$). 12 Monate nach Umstellung auf Belatacept näherten sich die Werte der beiden Untersuchungsgruppen an (M12; B1 vs. B2: 59/ μ l (28-86) vs. 51/ μ l (18-64), $p=0,607$) (**siehe Abbildung 15**). Bei dem Vergleich der Baseline-Werte mit den Werten nach Umstellung auf Belatacept ergab sich in Gruppe B1 in Monat sechs und neun ein signifikanter Rückgang der Th17-Zellen (**siehe Tabelle 16**). In Gruppe B2 dagegen waren im gleichen Zeitraum keine signifikanten Veränderungen verifizierbar. Bei dem Vergleich der beiden Studiengruppen mit den jeweiligen Kontrollgruppen fiel im Verlauf nur ein Unterschied bei Gruppe B2 in Monat neun auf. Hier zeigte sich bei den Kontroll-Patienten (K2) ein höherer Wert als bei den Studien-Patienten (**siehe Tabelle 17**).

Tabelle 16. Th17-Zellen der Gruppe Belatacept 1.

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1) Median (IQR)	BL vs. M P-Wert (Wilcoxon-Test)	CNI (K1) Median (IQR)	B1 vs. K1 P-Wert (Mann-Whitney U-Test)
Baseline (Zellen/ μ l)	67 (41-113)		66 (44-82)	0,779
Monat 3 (Zellen/ μ l)	44 (30-89)	0,250	62 (39-93)	0,493
Monat 6 (Zellen/ μ l)	47 (25-96)	0,031	54 (44-146)	0,226
Monat 9 (Zellen/ μ l)	32 (28-76)	0,008	72 (50-109)	0,067
Monat 12 (Zellen/ μ l)	59 (28-86)	>0,999	56 (50-101)	0,512

Tabelle 17. Th17-Zellen der Gruppe Belatacept 2.

Messzeitpunkt	Belatacept 2 (B2) Median (IQR)	BL vs. M P-Wert (Wilcoxon-Test)	mTORi (K2) Median (IQR)	B2 vs. K2 P-Wert (Mann-Whitney U-Test)
Baseline (Zellen/ μ l)	35 (28-65)		42 (22-63)	>0,999
Monat 3 (Zellen/ μ l)	54 (26-72)	0,652	40 (38-65)	0,813
Monat 6 (Zellen/ μ l)	38 (18-68)	>0,999	71 (40-95)	0,097
Monat 9 (Zellen/ μ l)	39 (26-59)	0,578	58 (51-80)	0,036
Monat 12 (Zellen/ μ l)	51 (18-64)	0,910	72 (48-153)	0,114

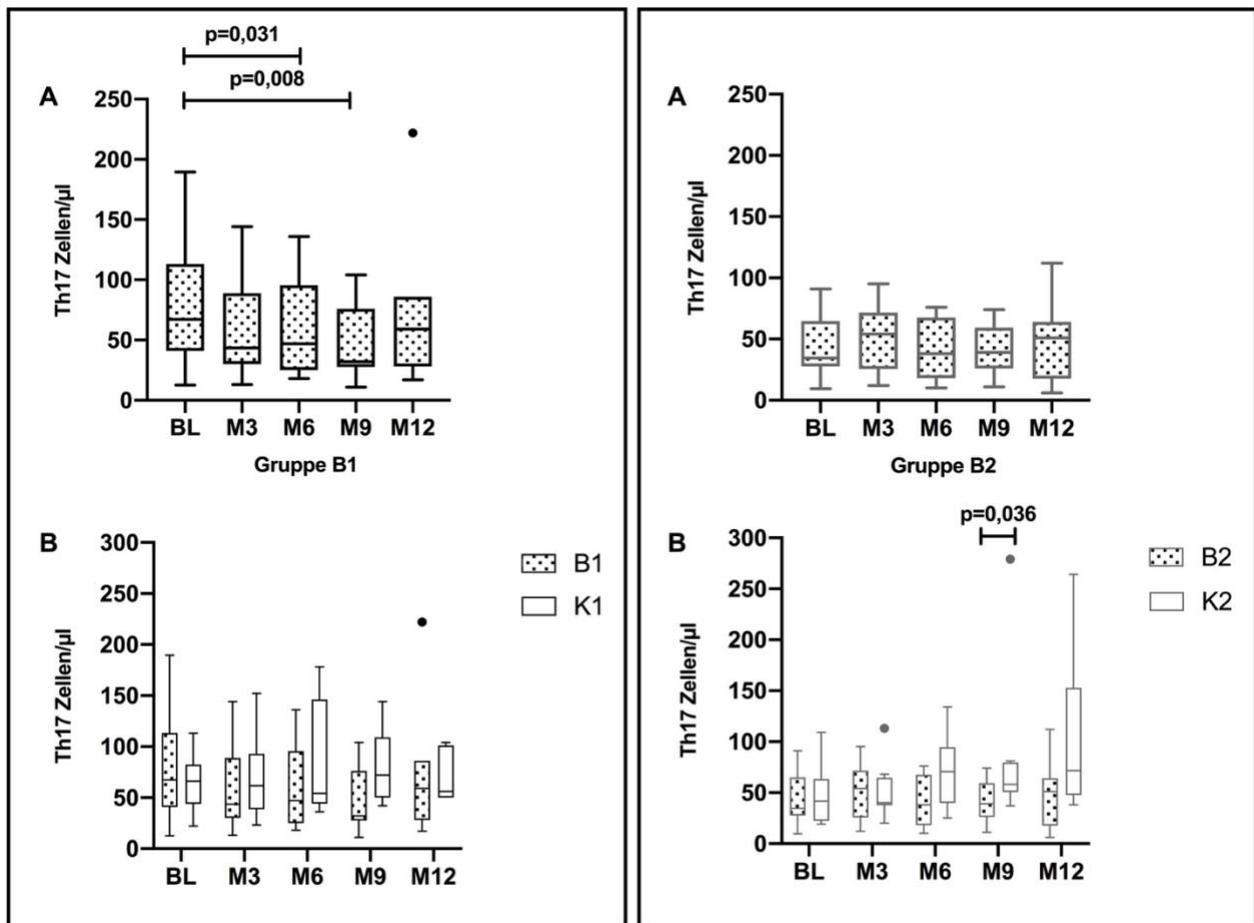


Abbildung 15. Analyse der Th17-Zellen. Darstellung der Anzahl der CD3+CD4+CXCR3-CCR6+ (Th17) Zellen in den Gruppen B1 und B2 im Verlauf (BL= Baseline; M= Monat) (A) und Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen K1 und K2 (B) als Boxplots. Vergleiche innerhalb einer Gruppe wurden mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt, zwischen verschiedenen Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test.

3.3.2.7 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Bei der Untersuchung der CD3+CD4+CD25+CD127^{low} -Zellen (T-regulatorische Zellen; Treg) fiel in beiden Studiengruppen ein Rückgang der Treg-Zellen im Monat neun auf (**siehe Abbildung 16**). In der Gruppe B1 wurde im Monat neun nicht nur im Vergleich zum Baseline-Wert eine signifikante Abnahme der Treg-Zellen nachgewiesen, sondern auch im Vergleich zur Kontrollgruppe (K1) (**siehe Tabelle 18**). Die Analyse der Gruppe B2 ergab ebenfalls einen deutlichen Rückgang neun Monate nach der Umstellung. Der Vergleich mit den Kontrollpatienten bei Monat neun war allerdings knapp nicht signifikant (**siehe Tabelle 19**).

Tabelle 18. Treg-Zellen der Gruppe Belatacept 1.

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1) Median (IQR)	BL vs. M P-Wert (Wilcoxon-Test)	CNI (K1) Median (IQR)	B1 vs. K1 P-Wert (Mann-Whitney <i>U</i> -Test)
Baseline (Zellen/ μ l)	30 (18-42)		39 (27-51)	0,248
Monat 3 (Zellen/ μ l)	24 (15-45)	0,551	30 (24-46)	0,202
Monat 6 (Zellen/ μ l)	24 (21-39)	0,188	30 (21-39)	0,779
Monat 9 (Zellen/ μ l)	18 (11-25)	0,004	35 (23-39)	0,005
Monat 12 (Zellen/ μ l)	25 (16-33)	0,070	34 (20-38)	0,211

Tabelle 19. Treg-Zellen der Gruppe Belatacept 2.

Messzeitpunkt	Belatacept 2 (B2) Median (IQR)	BL vs. M P-Wert (Wilcoxon-Test)	mTORi (K2) Median (IQR)	B2 vs. K2 P-Wert (Mann-Whitney <i>U</i> -Test)
Baseline (Zellen/ μ l)	23 (20-42)		25 (21-33)	0,982
Monat 3 (Zellen/ μ l)	19 (13-30)	0,156	25 (20-44)	0,142
Monat 6 (Zellen/ μ l)	23 (14-46)	0,344	34 (23-43)	0,368
Monat 9 (Zellen/ μ l)	15 (12-31)	0,039	29 (19-46)	0,079
Monat 12 (Zellen/ μ l)	24 (11-32)	0,242	39 (21-62)	0,088

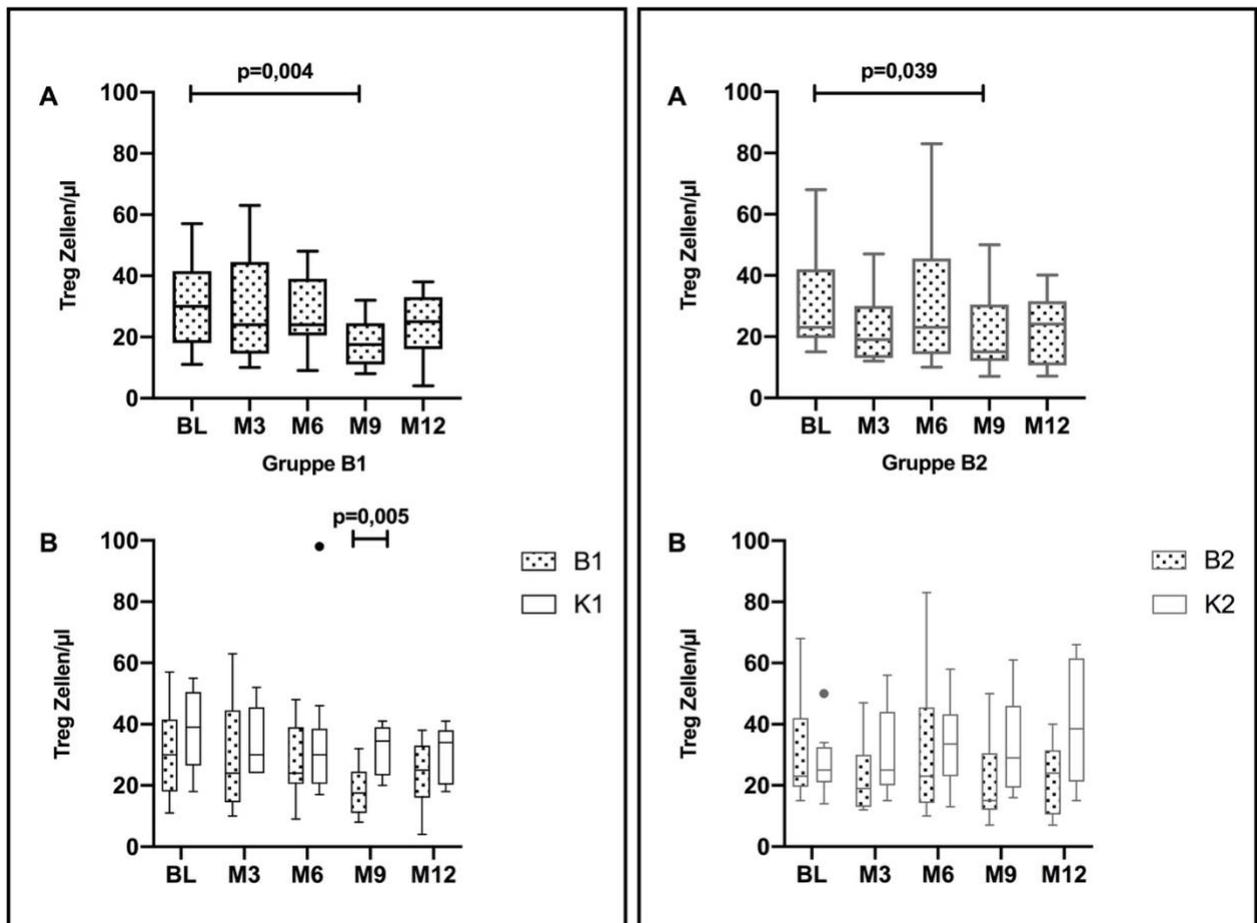


Abbildung 16. Analyse der T-regulatorischen Zellen. Darstellung der Anzahl der CD3+CD4+CD25+CD127low (Treg) Zellen in den Studiengruppen B1 und B2 im Behandlungsverlauf (BL= Baseline; M= Monat) (A) und Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen K1 und K2 (B) als Boxplots. Vergleiche innerhalb einer Gruppe wurden mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt, zwischen verschiedenen Gruppen mit dem Mann-Whitney *U*-Test.

3.3.2.8 Aktivierte Tregs

Die Messung der aktivierten Treg-Zellen (CD3+CD4+CD25+CD127low) erfolgte mit Hilfe der Detektion des Chemokin-Rezeptors CCR4. Beide Studiengruppen zeigten bei der Baselinemessung ein ähnliches Niveau an CCR4+ Treg-Zellen. Nach 12 Monaten unter Belatacept-Gabe zeigte sich in der B1-Gruppe keine Veränderung, in der B2-Gruppe verringerte sich die Anzahl, allerdings knapp nicht signifikant. Im Vergleich mit der korrespondierenden Kontrollgruppe K2 zeigte sich bei Monat 12 eine signifikant geringere Menge an aktivierten Treg-Zellen in der Belatacept Gruppe 2. In der Gruppe B1 trat kein Unterschied zu der Kontrollgruppe K1 auf (**siehe Tabelle 20**).

Tabelle 20. Aktivierte Treg-Zellen.

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1)		CNI (K1)	
	Median (IQR)	BL vs. M12 P-Wert (Wilcoxon-Test)	Median (IQR)	B1 vs. K1 P-Wert (Mann-Whitney <i>U</i> -Test)
Baseline (Zellen/ μ l)	12 (6-14)	0,344	13 (9-21)	0,559
M12 (Zellen/ μ l)	10 (5-14)		11 (9-19)	0,206
	Belatacept 2 (B2)		mTORi (K2)	
Baseline (Zellen/ μ l)	11 (8-20)	0,056	12 (10-19)	0,869
M12 (Zellen/ μ l)	4 (3-8)		15 (9-19)	0,006

3.3.2.9 Th17/Treg Ratio

Das Verhältnis zwischen Th17- und Treg-Zellen veränderte sich über den Untersuchungszeitraum weder in der Gruppe B1, noch in der Gruppe B2 signifikant. Insgesamt war in beiden Gruppen eine leicht abnehmende, aber statistisch nicht signifikante Tendenz festzustellen (**siehe Tabelle 21**).

Tabelle 21. Th17/Treg Ratio.

Th17 / Treg Ratio	Baseline Median (IQR)	Monat 12 Median (IQR)	BL vs. M12 (P-Wert, Wilcoxon-Test)
Belatacept 1 (B1)	0,5 (0,4-0,6)	0,3 (0,2-0,9)	0,625
Belatacept 2 (B2)	0,7 (0,5-1)	0,4 (0,3-0,9)	0,652

3.3.3 CD3+CD8+ T-Zellen

Der Anteil der CD3+CD8+ Zellen blieb im gesamten Untersuchungszeitraum unverändert. Weder in Gruppe B1 (BL vs. M12: 389/ μ l (168-550) vs. 238/ μ l (101-538), $p=0,813$) noch in Gruppe B2 (BL vs. M12: 431/ μ l (284-779) vs. 463/ μ l (273-853), $p=0,910$) ergaben sich Unterschiede im Vergleich zwischen Baseline und Monat 12. Auch im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (**siehe Abbildung 17**).

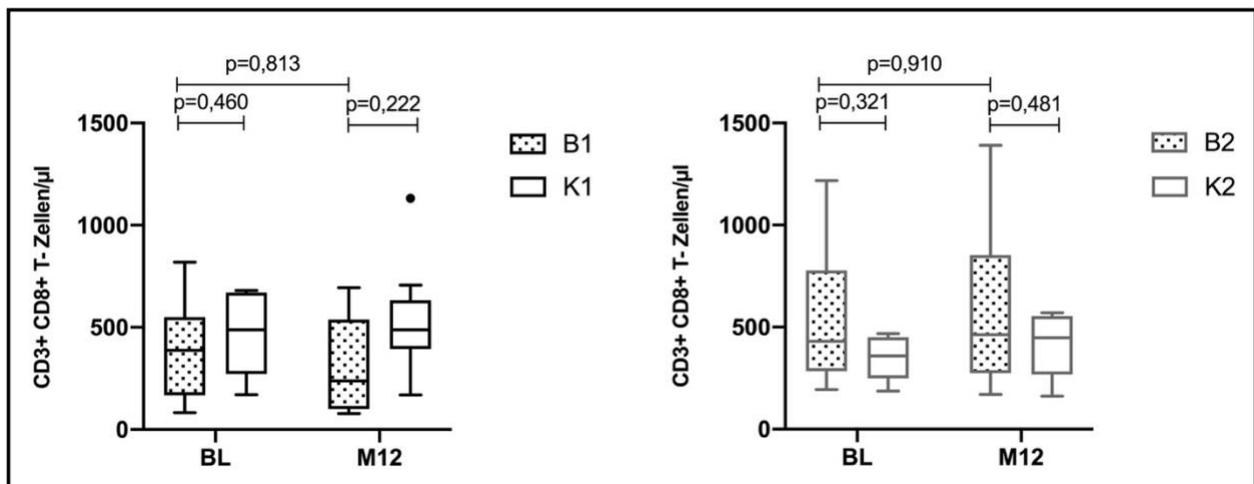


Abbildung 17. Analyse der CD8+ T-Zellen. Anzahl der CD3+CD8+ Lymphozyten. Dargestellt sind die Boxplots zu den Messzeitpunkten Baseline (BL) und Monat 12 (M12). Abgebildet sind die Gruppe Belatacept 1 (B1) mit CNI-Kontrollpatienten (K1) und die Gruppe Belatacept 2 (B2) mit mTORi-Kontrollpatienten (K2). Zur statistischen Analyse kam der Wilcoxon-Test bei Vergleich innerhalb einer Gruppe und der Mann-Whitney U-Test bei Vergleich von zwei unterschiedlichen Gruppen zur Anwendung.

3.3.3.1 CD8+ Subpopulationen

Die CD3+CD8+ Zellpopulation lässt sich entsprechend den CD3+CD4+ Zellen in vier Subpopulationen unterteilen: CCR7+CD45RA+ Naive CD8+Zellen (N), CCR7+CD45RA- Central Memory CD8+Zellen (CM), CCR7-CD45RA+ CD8+ Effector Zellen (E) und CCR7-CD45RA- CD8+ Effector Memory Zellen (EM). Weder in der Belatacept 1-Gruppe noch in der Belatacept 2-Gruppe kam es im Verlauf der Studie zu signifikanten Veränderungen (**siehe Tabelle 22**). Auch im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollgruppen konnten keine Unterschiede festgestellt werden (**siehe Tabelle 23**).

Tabelle 22. CD3+CD8+ T-Zellsubpopulationen. Vergleich innerhalb der Studiengruppen zwischen Baseline und Monat 12.

Zellen/ μ l	Belatacept 1 (B1)			Belatacept 2 (B2)		
	Median (IQR)			Median (IQR)		
	Baseline	M12	BL vs. M12 (P-Wert, Wilcoxon-Test)	Baseline	M12	BL vs. M12 (P-Wert, Wilcoxon-Test)
CM	383 (156-823)	224 (126-587)	>0,999	442 (245-761)	516 (289-915)	0,426
N	284 (178-558)	425 (223-587)	0,469	143 (75-599)	168 (103-638)	0,820
EM	526 (255-899)	447 (230-593)	0,078	430 (220-716)	458 (293-663)	0,910
E	22 (7-38)	25 (17-55)	0,578	11 (4-57)	6 (4-31)	0,266

CM, Central Memory, N Naive, EM, Effector Memory und E, Effector Zellen.

Tabelle 23. CD3+CD8+T-Zellsubpopulationen. Vergleich zwischen Studiengruppen und Kontrollgruppen im Monat 12.

Zellen/ μ l	Belatacept 1 vs. Kontrolle 1 (CNI)			Belatacept 2 vs. Kontrolle 2 (mTORi)		
	Median (IQR)			Median (IQR)		
	B1 (M12)	K1 (M12)	B1 vs. K1 P-Wert (Mann-Whitney <i>U</i> -Test)	B2 (M12)	K2 (M12)	B2 vs. K2 P-Wert (Mann-Whitney <i>U</i> -Test)
CM	224 (126-587)	437 (204-795)	0,315	516 (289-915)	360 (193-548)	0,436
N	425 (223-587)	307 (173-517)	0,460	168 (103-638)	282 (82-650)	>0,999
EM	447 (230-593)	704 (450-836)	0,065	458 (293-663)	547 (449-737)	0,489
E	25 (17-55)	42 (24-60)	0,305	6 (4-31)	12 (4-50)	0,501

CM, Central Memory, N Naive, EM, Effector Memory und E, Effector Zellen.

3.3.3.2 Aktivierte CD8+ Zellen

Die Anzahl der aktivierten CD8+ Zellen (CD3+CD8+CD38+HLA-DR+) veränderte sich über den Zeitraum der Studie nicht signifikant. Auffallend ist jedoch, dass die Streuung sowohl in der Belatacept 1- Gruppe (B1, BL vs. M12: 9/ μ l (5-18) vs. 23/ μ l (9-123), $p=0,109$) als auch in der Belatacept 2 Gruppe (B2, BL vs. M12: 24/ μ l (4-28) vs. 32/ μ l (8-82), $p=0,164$) im Laufe der Studie zunahm. Auch im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollgruppen traten keine signifikanten Unterschiede weder bei der Baseline-Messung, noch im Monat 12 der Studie auf (**siehe Abbildung 18**).

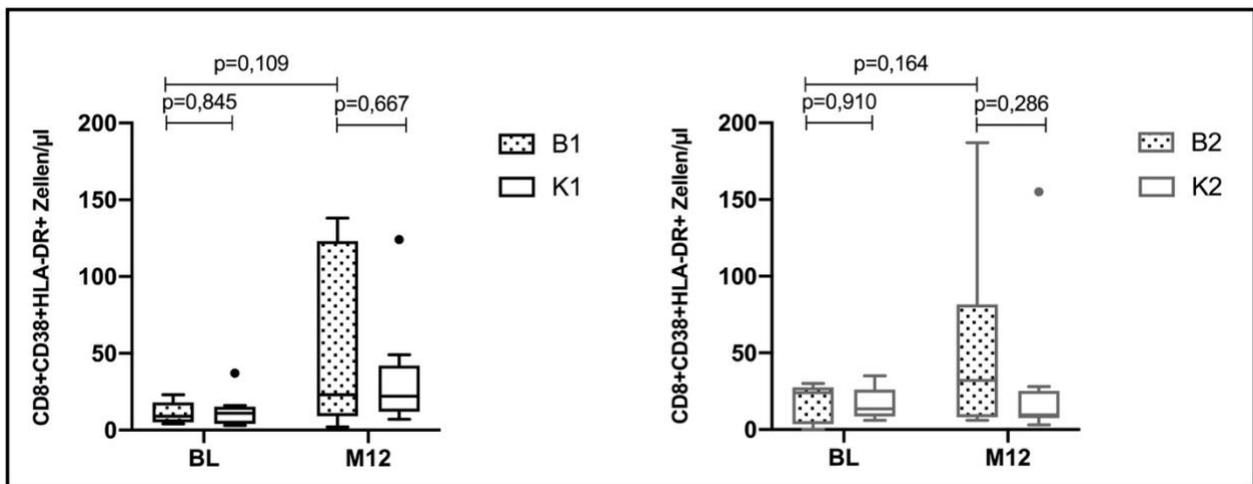


Abbildung 18. Analyse der aktivierten CD8+ T-Zellen. Anzahl der CD38- und HLA-DR-positiven CD3+CD8+Lymphozyten. Dargestellt sind die Gruppen B1 und B2 zum Baseline-Zeitpunkt (BL) und im Monat 12 (M12) sowie der Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Zum Vergleich innerhalb einer Gruppe wurde der Wilcoxon-Test angewandt, zum Vergleich von verschiedenen Gruppen der Mann-Whitney U-Test.

3.3.3.3 CD4/CD8 Ratio

Die CD4/CD8 Ratio veränderte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum in keiner der untersuchten Patientengruppen. Auch bei der Gegenüberstellung mit den jeweiligen Kontrollgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt (**siehe Tabelle 24**).

Tabelle 24. CD4/CD8 Ratio

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1)		CNI (K1)	
	Median (IQR)	BL vs. M12 P-Wert (Wilcoxon-Test)	Median (IQR)	B1 vs. K1 P-Wert (Mann-Whitney U-Test)
Baseline (Ratio)	2,2 (1,6-3,9)	0,719	2,5 (1,6-3,6)	0,965
M12 (Ratio)	3,3 (1,7-7,0)		1,8 (1,6-3,0)	0,213
	Belatacept 2 (B2)		mTORi (K2)	
Baseline (Ratio)	1,4 (0,95-2,3)	>0,999	2,2 (1,2-3,4)	0,266
M12 (Ratio)	1,3 (0,85-2,8)		2,4 (1,2-3,6)	0,208

3.4 Interleukin-17-Konzentration im peripheren Blut

3.4.1 ELISA IL-17A

Die IL-17A-Konzentration im Plasma war in Gruppe Belatacept 2 von der Baseline-Messung bis Monat sechs im Vergleich zu allen anderen erfassten Gruppen erhöht (**siehe Tabelle 26**). Bereits bei der Baseline-Messung war die IL-17A-Konzentration in dieser Gruppe fünfmal so hoch wie in der Gruppe Belatacept 1 (**siehe Tabelle 25**) und dreimal so hoch wie in der entsprechenden mTORi-Kontrollgruppe. Auch im Monat drei nach Umstellung war der Wert signifikant höher als in Gruppe B1. Erst im Monat sechs sank der Wert leicht und zeigte keinen signifikanten Unterschied mehr zu Gruppe B1. Im Vergleich zur mTORi-Kontrollgruppe, die über den gesamten Zeitraum einen konstant niedrigen IL-17A Spiegel aufwies, waren die Werte der Gruppe Belatacept 2 im Monat drei signifikant höher. Im Kontrast dazu zeigten sowohl die Gruppe B1 als auch ihre korrespondierende Kontrollgruppe K1 konstant niedrige IL-17A Werte (**alle Werte siehe Tabellen 25 und 26**).

Tabelle 25. IL-17A Konzentration im Plasma der Studiengruppe B1 und Kontrollgruppe K1.

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1)		CNI (K1) *	
	Median (IQR)	BL vs. M P-Wert (Wilcoxon-Test)	Median (IQR)	B1 vs. K1 P-Wert (Mann-Whitney <i>U</i> -Test)
Baseline (pg/ml)	2,8 (2,2-6,1)		2,3 (1,8-4,9)	0,362
Monat 3 (pg/ml)	2,3 (0,7-6,8)	0,383	2,0 (1,0-3,4)	0,700
Monat 6 (pg/ml)	2,8 (2,0-6,5)	0,547	2,0 (1,6-6,3)	0,589

* Bei einem Patienten der CNI-Kontrollgruppe waren keine für den ELISA ausreichenden Proben vorhanden. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen entschieden wir uns dafür, diese Proben durch die Proben eines vergleichbaren CNI-Patienten, welcher über sechs Monate gemessen wurde, zu ersetzen.

Tabelle 26. IL-17A Konzentration im Plasma der Studiengruppe B2 und Kontrollgruppe K2.

Messzeitpunkt	Belatacept 2 (B2)		mTORi (K2)	
	Median (IQR)	BL vs. M P-Wert (Wilcoxon-Test)	Median (IQR)	B2 vs. K2 P-Wert (Mann-Whitney <i>U</i> -Test)
Baseline (pg/ml)	15,0 (10,3-25,5)		5,9 (2,5-12,2)	0,081
Monat 3 (pg/ml)	14,8 (9,8-17,3)	0,375	3,4 (2,0-8,6)	0,018
Monat 6 (pg/ml)	11,0 (4,6-17,0)	0,094	4,2 (1,4-9,5)	0,171

3.5 Klinische Parameter

3.5.1 Glomeruläre Filtrationsrate

Nach der Umstellung auf Belatacept zeigte sich eine Veränderung der eGFR-Werte vor allem bei den von CNi umgestellten Patienten (B1). Diese starteten im Vergleich zu den von einem mTORi umgestellten Patienten (B2) mit einem niedrigeren Baselinewert (BL, B1 vs. B2: 27ml/min (21-47) vs. 43ml/min (30-57), $p=0,098$; **siehe Abbildung 19**). Dieser Wert erhöhte sich bis zum Monat sechs nach der Umstellung signifikant. Auch in den Monaten neun und 12 zeigte sich im Vergleich zum Ausgangswert ein signifikanter Anstieg der eGFR. Bei Patienten der Gruppe B2 dagegen blieben die eGFR-Werte im Verlauf unverändert (**alle Werte siehe Tabelle 27**).

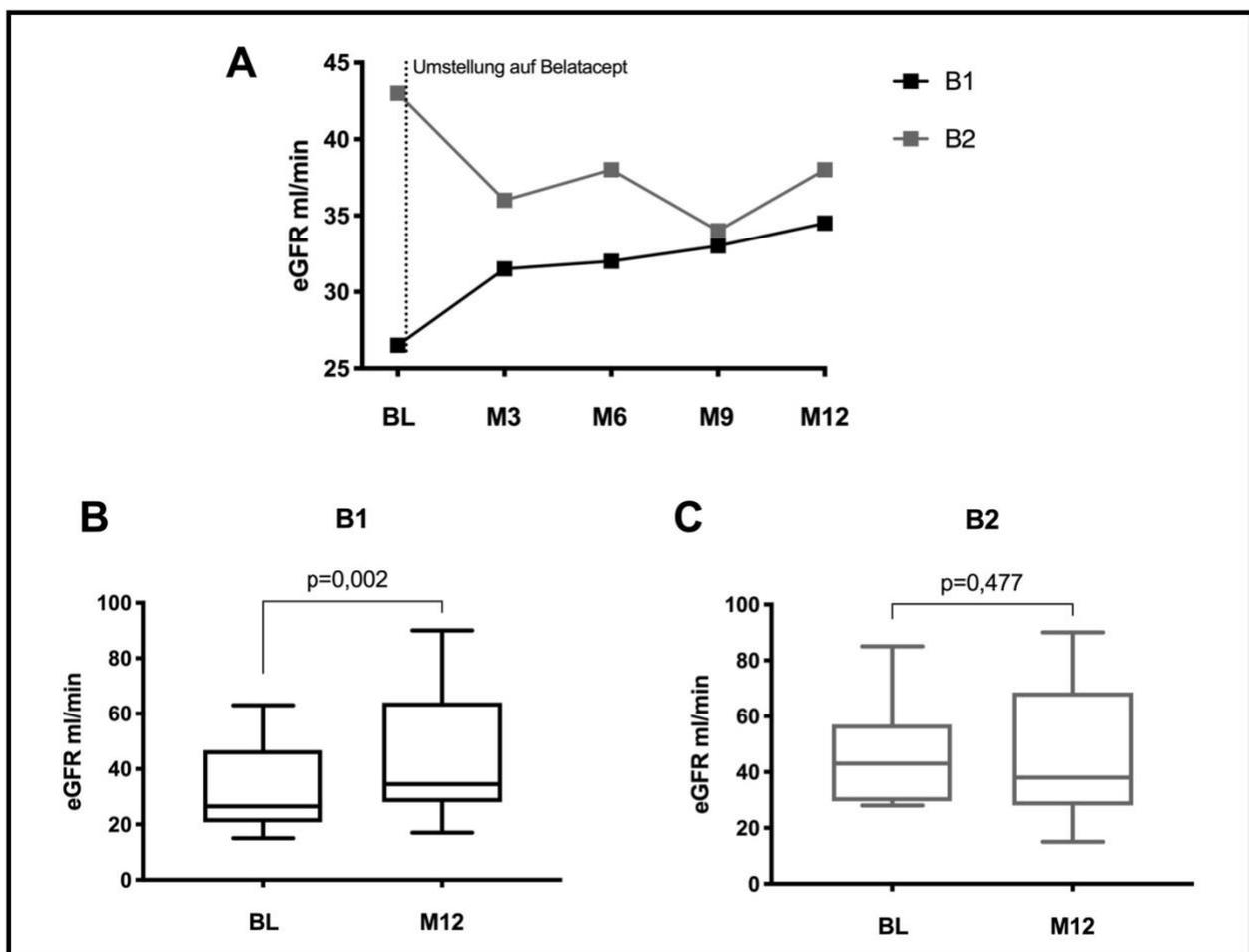


Abbildung 19. Analyse der eGFR. Dargestellt ist der Median der eGFR in ml/min im zeitlichen Verlauf für die Baseline-Messung (BL), sowie Monat (M) 3, 6, 9 und 12 für beide Belatacept-Gruppen (B1 und B2) (A). Box-Plot-Darstellung beider Belatacept-Gruppen zu den Zeitpunkten BL und M12 (B, C). Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Wilcoxon-Tests.

Tabelle 27. Berechnete glomeruläre Filtrationsrate - eGFR.

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1) Median (IQR)	BL vs. M P-Wert (Wilcoxon-Test)	Belatacept 2 (B2) Median (IQR)	BL vs. M P-Wert (Wilcoxon-Test)
Baseline (ml/min)	27 (21-47)		43 (30-57)	
Monat 3 (ml/min)	32 (22-54)	0,246	36 (30-53)	0,438
Monat 6 (ml/min)	32 (26-68)	0,004	38 (29-57)	0,555
Monat 9 (ml/min)	33 (27-70)	0,006	34 (30-63)	0,609
Monat 12 (ml/min)	35 (28-64)	0,002	38 (28-69)	0,477

3.5.2 Albumin-Kreatinin-Quotient

Bei der Untersuchung der Albuminurie fiel in der Gruppe Belatacept 1 im zeitlichen Verlauf nach Umstellung auf Belatacept ein leichter Anstieg des Albumin-Kreatinin-Quotienten auf. Nach sechs Monaten zeigte sich eine signifikante Zunahme im Vergleich zu den Baseline-Werten (**siehe Tabelle 28**). In den Monaten neun und 12 zeigte sich der Median-Wert ebenfalls höher im Vergleich zum Baseline Wert, allerdings knapp nicht signifikant. Die Werte der Gruppe Belatacept 2 waren über den Untersuchungszeitraum vergleichsweise größeren Schwankungen unterlegen (**siehe Abbildung 20**) und zeigten unter der Belatacept-Therapie keine signifikante Änderung im Vergleich zu der Baseline-Messung unter Ausgangsmedikation.

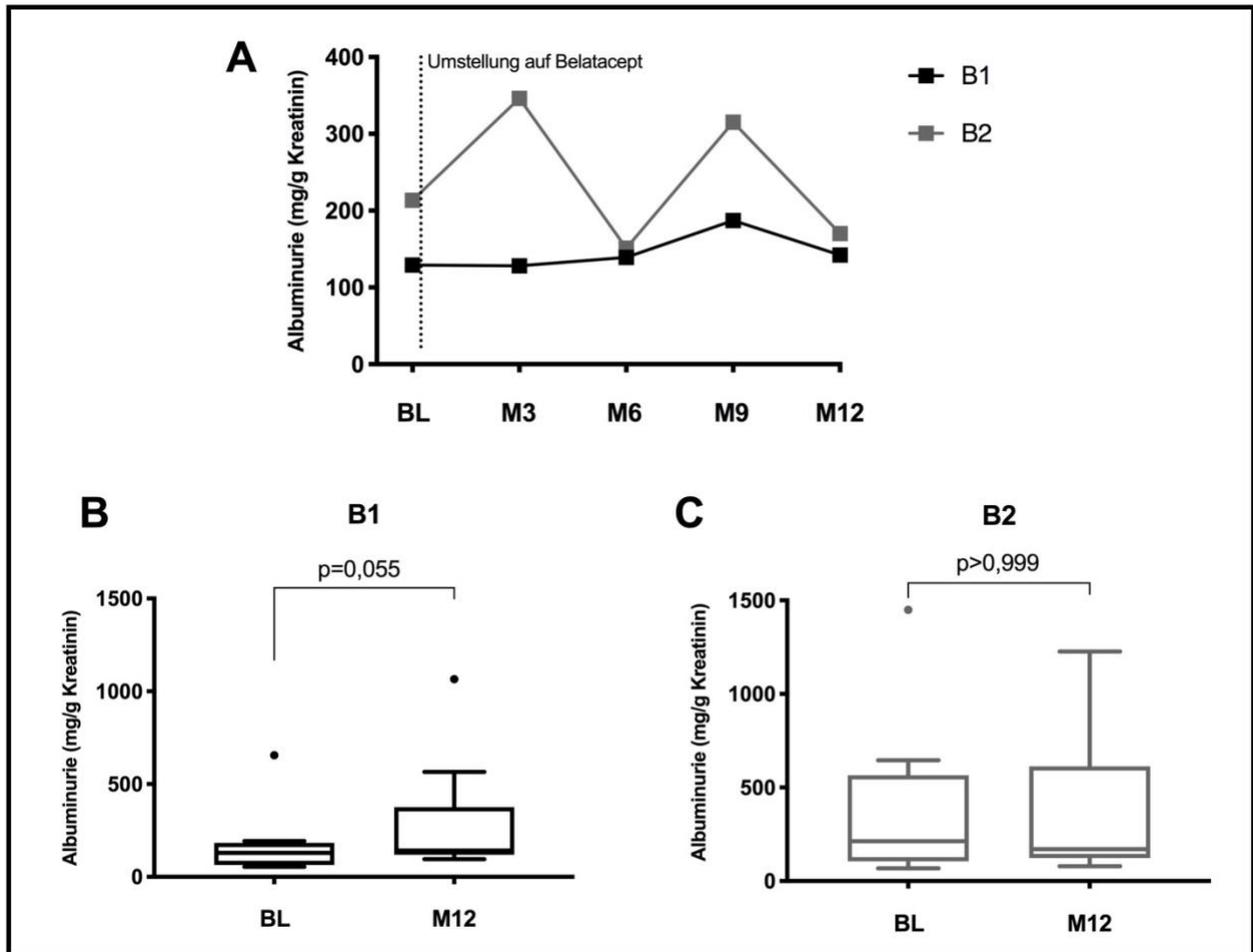


Abbildung 20. Analyse der Albuminurie. Dargestellt ist der Albumin/Kreatinin-Quotient im Spontan-Urin in mg Albumin/g Kreatinin im zeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten Baseline (BL), sowie Monat (M) 3, 6, 9 und 12 für beide Belatacept-Gruppen (B1 und B2) (**A**). Box-Plot-Darstellung beider Belatacept-Gruppen zu den Zeitpunkten Baseline und M12 (**B, C**). Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Wilcoxon-Tests.

Tabelle 28. Albumin-Kreatinin Quotient

Messzeitpunkt	Belatacept 1 (B1) Median (IQR) in mg Albumin / g Kreatinin	BL vs. M P-Wert (Wilcoxon-Test)	Belatacept 2 (B2) Median (IQR) in mg Albumin / g Kreatinin	BL vs. M P-Wert (Wilcoxon-Test)
Baseline	129 (64-183)		214 (106-566)	
Monat 3	128 (81-163)	0,727	346 (128-682)	0,742
Monat 6	139 (89-217)	0,020	151 (119-382)	0,148
Monat 9	187 (104-320)	0,055	315 (109-438)	0,711
Monat 12	142 (119-376)	0,055	170 (123-614)	>0,999

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des Immunsuppressivums Belatacept auf das Profil der T-Zellsubpopulationen bei nierentransplantierten Patienten im Rahmen einer prospektiven Studie über einen Zeitraum von 12 Monaten zu untersuchen. Die Patienten wurden von einer CNI- oder einer mTORi-basierten Ausgangstherapie auf Belatacept umgestellt. Parallel dazu untersuchten wir vergleichbare Kontrollpatienten unter unveränderter Erhaltungsimmunosuppression mit CNI oder mTORi. Es sollten spezifische Veränderungen in der Zusammensetzung der T-Zell Subpopulationen aufgedeckt werden, die möglicherweise an der Entwicklung von Rejektionen beteiligt sind. Zusätzlich wurde die Nierenfunktion in Form der eGFR und der Albuminurie untersucht, um ergänzend zu den immunologischen Markern auch klinisch relevante Veränderungen zu erfassen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Studie diskutiert und vor dem Hintergrund der bestehenden wissenschaftlichen Erkenntnisse zu diesem Thema eingeordnet.

4.1 Einfluss der Ko-Stimulationsblockade auf die peripheren T-Lymphozyten

4.1.1 CD3+CD4+ Subpopulationen

Die Immunsuppression über die Ko-Stimulationsblockade mit Belatacept greift hemmend in den Prozess der T-Zellaktivierung ein und kann so ungewollte Immunreaktionen unterdrücken. Bei der Analyse der CD3+ Ausgangs-T-Zellpopulation sowie ihrer CD4+ Untergruppe zeigten sich keine Veränderungen nach Umstellung der Medikation auf Belatacept. Diese erste Auswertung der Elternpopulation diente auch als Auskunft darüber, wie viele T-Zellen peripher zirkulieren, da sich die untergeordneten T-Zellpopulation auf sie beziehen. Erst bei weiterer Differenzierung der CD3+CD4+ Zellen in funktionelle Untergruppen wurden Veränderungen abhängig von ihrem Entwicklungsstadium sichtbar. So zeigte sich in der von CNI auf Belatacept umgestellten Gruppe B1 eine Zunahme der naiven CD4+ T-Zellen, die vermehrt CD28 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Für ihre Aktivierung sind diese Zellen neben der Ag/MHC-TZR-Verbindung auf die Ko-Stimulation angewiesen⁹⁶. Wenn die Aktivierung und Weiterentwicklung der naiven T-Zellen in Effektor T-Zellen blockiert wird, verfallen sie in Anergie³⁴ und der Anteil der peripher gemessenen naiven T-Zellen steigt. Malvezzi *et al.*⁹⁷ fanden übereinstimmend mit unseren Ergebnissen bei Patienten, die von CNI auf Belatacept umgestellt wurden, eine Zunahme der durchflusszytometrisch erfassten naiven T-Zellen. In der Gruppe B2 unserer Studie gab es demgegenüber ein Jahr nach Konversion auf

Belatacept keine signifikante Veränderung der naiven T-Zellen. Der Wirkmechanismus der Ausgangsmedikation mTORi greift ähnlich wie Belatacept in die T-Zellaktivierung und Differenzierung ein⁹⁸. Möglicherweise sind in den funktionellen CD4+Untergruppen dieser Gruppe keine quantitativen Veränderungen aufgetreten, weil der Ansatzpunkt beider Medikamente ähnlich ist.

Wie zuvor erwähnt, benötigen naive T-Zellen die Ko-Stimulation über CD28 um sich zu Effektorzellen weiterzuentwickeln^{96,99}. Dementsprechend sollten die zirkulierenden Effektorzellen ohne CD28-Ko-Stimulation nicht zunehmen, sondern stagnieren oder sich reduzieren. In der B1- als auch in der B2-Studiengruppe konnten keine Veränderungen bei den CD4+ Effektorzellen beobachtet werden. Bei den Effektor-Memory-Zellen dagegen zeigte sich in Gruppe B1 eine Reduktion. Diese Zellpopulation ist Antigen-erfahren und kann bei wiederholtem Antigenkontakt schnell und spezifisch eine Immunantwort auslösen¹⁰⁰. Dieser Gedächtnisabruf und die Aktivierung der EM-Zellen kann auch ohne CD28-Ko-Stimulation ablaufen, allerdings sind die EM-Zellen für ihre Proliferation und Expansion ebenfalls auf die CD28-Ko-Stimulation angewiesen¹⁰¹. Im Gegensatz zu *de novo* aktivierten Effektor-Zellen benötigen sie nur eine verkürzte Antigenpräsentation, haben eine reduzierte Aktivierungsschwelle sowie verbesserte Migrations- und Adhäsionsmechanismen. Aufgrund dieser schnelleren Reaktionsfähigkeit können Effektor-Memory Zellen bei der Entstehung von Abstoßungsreaktion gegen Allotransplantate eine entscheidende Rolle spielen¹⁰². Ursprünglich CD28-positive T-Zellen regulieren nach allogener Stimulation das Oberflächenmolekül CD28 herunter³³ und können so auch unter der CD28-Ko-Stimulations-Blockade eine Immunreaktion auslösen. Dieser Ansatz ist eine mögliche Erklärung für die Frage, wie sich Rejektionen unter Belatacept entwickeln können. Der *in vitro* Versuch von de Graav *et al.*¹⁰³ zeigte, dass die Antigen-erfahrenen Effektor-Memory-T-Zellen weniger auf die Ko-Stimulationsblockade durch Belatacept ansprechen und so die Proliferation dieser T-Zellen nicht vollständig gehemmt werden kann. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch entgegen dieser Hypothese eine Verminderung (B1) bzw. Stagnation (B2) der EM-Zellen. Dementsprechend scheint sich unter der Ko-Stimulationsblockade bei stabilen Bedingungen *in vivo* ein weniger reaktives EM-T-Zellprofil zu entwickeln.

Die in den sekundären lymphatischen Organen ruhenden Central-Memory T-Zellen haben ähnlich wie EM-T-Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber antigener Stimulation und können sich daraufhin schnell zu Effektor-T-Zellen differenzieren¹⁰⁴. In unserer

Studie zeigten sich bei diesen Zellen ein nicht signifikanter Anstieg in Gruppe B2 nach medikamentöser Konversion und eine im Vergleich zur mTORi-Kontrollgruppe signifikant höhere Zellzahl. Eine Bestätigung für diese Beobachtung gibt die Studie von Chen *et al.*¹⁰⁵, wonach die mTOR-Inhibition bei Memory-CD4+ T-Zellen die Expression von Zytokinen verringert und die Apoptose fördert.

Bei der Analyse der aktivierten CD3+CD4+CD38+HLA-DR+ Zellen zeigten beide Belatacept-Konversionsgruppen keine Veränderungen. Erwartungsgemäß sollten diese zirkulierenden aktivierten Zellen, wie zuvor erörtert, unter der Ko-Stimulationsblockade abnehmen, so wie es von Eichmann *et al.*¹⁰⁶ beschrieben wurde. Allerdings handelt es sich bei dieser Zellpopulation um hochdifferenzierte Effektorzellen, die eventuell über andere Mechanismen, auch ohne CD28-Ko-Stimulation, aktiviert werden können¹⁰⁷ und deren durchflusszytometrische Erfassung aufgrund der kleinen Population sehr anspruchsvoll ist.

Zusammenfassend können unsere Ergebnisse dahingehend interpretiert werden, dass die Immunsuppression durch Belatacept bei Tx-Patienten unter vorheriger CNI-Medikation die Alloreaktivität naiver T-Zellen inhibiert und die Anzahl von vorgeprägten Effektor-Memory-T-Zellen reduziert. Unter stabilen Bedingungen unter Belatacept scheinen die Effektor-T-Zellen sowie die aktivierten T-Zellen zu stagnieren.

4.1.2 Th1/Th2 Zellen

Nach den hochdifferenzierten CD4+ Untergruppen beleuchten wir nun die klassischen Th1- (CD3+CD4+CXCR3+CCR6-) und Th2- (CD3+CD4+CXCR3-CCR6-) Populationen. Die beiden Zelllinien unterscheiden sich über ihr Zytokinprofil in der Art der Immunantwort, die sie auslösen. Th1-Zellen aktivieren die Zell-vermittelte Immunreaktion und wirken pro-inflammatorisch, Th2-Zellen dagegen fördern die Antikörpersynthese. Früher wurde angenommen, dass Abstoßungsreaktionen von Organtransplantaten hauptsächlich über die Th1-Zellantwort und das von ihnen produzierte IFN- γ vermittelt werden. Th2-Zytokine wirken hemmend auf die Th1-Zellen und damit anti-inflammatorisch¹⁰⁸. Aktuellere Studien sehen dieses Paradigma weniger starr und zeigen, dass Th2-Zytokine durchaus auch ursächlich für chronische Transplantat-Rejektionen sein können¹⁰⁹ und Th2-Zellen nicht nur protektiv wirken müssen¹¹⁰. In Biopsien von nierentransplantierten Patienten, die unter einer akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion litten, konnten Obata *et al.*¹¹¹ eine hohe IFN- γ -Expression nachweisen, was bestätigt, dass Th1-Mechanismen Rejektionen vermitteln können. Bei Proben von

Patienten mit chronischen Rejektionen konnte auch die Mitwirkung von Th2-Zytokinen belegt werden¹¹¹.

In unserer Studie zeigte sich in Gruppe B2 eine signifikante Abnahme der Th1-Zellen unter Belatacept. Auch in Gruppe B1 kam es zu einer Reduktion der Th1-Zellen, die allerdings nicht signifikant war. Entsprechend zeigten Sabet-Baktach *et al.*¹¹² im Tierversuch, dass die Th1-, aber nicht die Th2-Immunantwort mittels Ko-Stimulationsblockade effektiv unterdrückt werden kann. Auch in unserer klinischen Studie zeigten sich in der Th2-Subpopulation unter Belatacept-Therapie keine signifikanten Veränderungen. Die Th1/Th2-Ratio blieb trotz der sinkenden Th1-Zahlen im Studienverlauf konstant. Pathohistologisch zeigten sich in Biopsien von stabilen nierentransplantierten Patienten unter Belatacept-Therapie im Vergleich zu Patienten mit CNI-Immunsuppression keine Unterschiede in Bezug auf die Marker der Th1- und Th2-T-Zell Subpopulationen¹¹³. Ob das Expressionsniveau dieser Zelllinien im Blut oder im Nierentransplantat die langfristige Inzidenz von Abstoßungsreaktionen beeinflusst, ist ein interessanter Ansatz für zukünftige Forschung.

Zusammenfassend konnten wir nach Konversion eine Reduktion der mit dem Rejektionsgeschehen assoziierten zirkulierenden Th1-Zellen feststellen, was auf die Etablierung eines anti-inflammatorischen Milieus unter Ko-Stimulationsblockade mit Belatacept in unserer Studie schließen lässt.

4.1.3 Th17+ Zellen

Die vermehrte Aktivierung von Th17-Zellen steht im Zusammenhang mit der Entwicklung von schweren Abstoßungsreaktionen und Transplantatversagen¹¹⁴. Daher könnte die pharmakologische Modulation dieser pro-inflammatorischen Zellen, jedenfalls theoretisch, eine verbesserte Transplantatfunktion sowie ein längeres Transplantatüberleben ermöglichen.

Bei der Baseline-Messung der von uns untersuchten Konversions-Gruppen starteten die CNI-Patienten im Vergleich zu den mTORi-Patienten von einem höheren Niveau an CD3+CD4+CXCR3-CCR6+ (Th17+) Zellen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen einer Studie von Li *et al.*¹¹⁵ überein, wonach eine Therapie mit CNI im Vergleich zu mTORi *in vivo* zu höheren Th17- und niedrigeren Treg-Zellzahlen führt. Eine mögliche Erklärung für die höheren Th17-Ausgangswerte der CNI-Patienten könnte die Hemmung von IL-2 durch den Calcineurininhibitor sein. IL-2 ist ein wichtiger Faktor für die Entwicklung von Tregs und für die Hemmung von Th17+ Zellen¹¹⁶. Aufgrund der

Hemmung von IL-2 unter CNI kann die Th17/Treg Ratio zu einem pro-inflammatorischen Milieu verschoben werden. Demzufolge ist allein schon aufgrund des Wegfalls dieser Hemmung eine Änderung in der Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen zu erwarten. Unsere Ergebnisse unterstützen diese Hypothese, denn schon sechs Monate nach Umstellung von CNI auf Belatacept zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Th17-Zellen. Diese Reduktion ließ sich auch im Monat neun der Studie nachweisen, im Monat 12 war die Th17-Anzahl im Vergleich zur Baseline-Messung ebenfalls verringert, allerdings nicht mehr signifikant.

Studien, in denen Belatacept als *de novo* Therapie eingesetzt wurde, zeigen ähnliche Effekte. So beobachteten Vondran *et al.*¹¹⁷ bei langzeitbehandelten Belatacept-Patienten gleichfalls einen niedrigeren Anteil an Th17+ Zellen als bei CNI-Patienten. Diese Beobachtung konnte von Furuzawa-Carballeda *et al.*¹¹⁸ in der BENEFIT-Studie histologisch an Biopsien nierentransplantierte Patienten bestätigt werden. Zwölf Monate nach Transplantation wiesen Patienten unter Belatacept-Induktion im Vergleich zu Patienten unter CNI-Induktion eine geringere Anzahl von (CD4+/IL17A+) Th17 Zellen und mehr (FoxP3+) Treg-Zellen in den Nierenbiopsien auf. Auch in der 10-Jahres Nachfolgestudie von Furuzawa-Carballeda *et al.*¹¹⁹ konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Aussagekräftige klinische Studien über den Einfluss von Belatacept auf Th17-Zellen im zeitlichen Verlauf sind rar. Matsutani *et al.*¹²⁰ wiesen nach, dass die Gabe des Vorgängerpräparates Abatacept bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nach sechs Monaten zu einer Reduzierung der Th17-Zellen (CD4+IL-17A+) *in vivo* führt. Ihrer Hypothese nach ist die ebenfalls verminderte IL-6-Expression unter Abatacept-Therapie ursächlich für die verringerte Th17-Zellproliferation. Tatsächlich ist IL-6 ein wichtiger Regulator in der Th17/Treg-Balance¹²¹. IL-6 wird von verschiedenen Abwehrcellen produziert und ist als pro-inflammatorisches Zytokin neben anderen Faktoren für die Reifung von Th17-Zellen verantwortlich¹²¹. Es konnte eine dosisabhängige Reduktion von IL-6 unter Abatacept *in vivo* nachgewiesen werden^{122,123}. Insgesamt kann die von uns nachgewiesene Reduktion der Th17+ Zellen in Gruppe B1 einerseits aufgrund des fehlenden CNI-Einflusses, andererseits als Folge der Ko-Stimulationsblockade oder auch als Folge einer Kombination beider Faktoren entstanden sein.

In der von mTORi konvertierten Gruppe B2 zeigte sich über den Studienzeitraum keine Veränderung der Th17-Zellen. Im direkten Vergleich mit den mTORi-Kontrollpatienten zeigte sich allerdings im Monat neun eine signifikant niedrigere Th17-Zellzahl in Gruppe B2. Dabei scheint auch mTORi, wie von Kim *et al.*¹²⁴ beschrieben, einen inhibierenden

Effekt auf die Th17-Zellpopulation über die Hemmung der Phosphorylierung von STAT3, einem Transkriptionsfaktor für ROR γ t, zu haben. Klinisch konnten Kim *et al.*¹²⁴ in einer kleinen Gruppe nierentransplantierte Patienten, die von CNI auf mTORi umgestellt wurden, bereits einen Monat nach Konversion eine Verminderung der Th17-Zellen nachweisen. Auch in den Baseline-Werten unserer Studien- und Kontrollgruppen konnten wir, wie eingangs erwähnt, unter mTORi-Therapie niedrigere Th17-Werte als unter CNI feststellen. Die einmalig niedrigere Zellzahl unter Belatacept-Therapie im Vergleich zur mTORi-Kontrollgruppe kann auch ein zufälliger Effekt der kleinen Gruppengröße sein, oder ist auf die zuvor diskutierte IL-6-abhängige Hemmung der Th17-Zellen unter Ko-Stimulationsblockade zurückzuführen.

Doch wie lassen sich die unter Belatacept vermehrt auftretenden und teilweise schweren Abstoßungsreaktionen^{82,84,88} erklären, wenn die T-Zell vermittelte Immunreaktion unterdrückt wird? IL-17 und andere von Th17+ Zellen produzierte Zytokine, wie z.B. IL-23, werden mit Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation assoziiert. So wurde eine erhöhte IL-17-Expression bei Abstoßung von Nierentransplantaten schon 1998 immunhistologisch nachgewiesen¹²⁵. Auch in nachfolgenden Studien wurde gezeigt, dass eine erhöhte IL-17- und IL-23-Expression^{126,127,128} mit dem Auftreten von Abstoßungsreaktionen korreliert. Die Tatsache, dass die Th17-Zellzahl und -Funktion Einfluss auf die Entwicklung von Toleranz gegenüber einem Nierentransplantat hat, konnten Nova-Lamperti *et al.*¹²⁹ in PBMCs von toleranten nierentransplantierten Patienten nachweisen. Hier fanden sich signifikant weniger Th17-Zellen sowie reduzierte Th17-Zellfunktionen im Vergleich zu PBMCs von Patienten mit chronischer Rejektion oder gesunden Kontrollpersonen. Zusammenfassend scheint die pharmakologische Hemmung der Th17-Zelle und ihrer Zytokine ein wichtiger Faktor für die Prävention von schädigenden Immunreaktionen gegen das Transplantat zu sein.

Die Antwort auf die zuvor gestellte Frage kann natürlich nicht nur mit Blick auf einen einzelnen Zelltyp gegeben werden. Die Abstoßung von Allotransplantaten ist ein immunologisch komplexer, multifaktorieller Prozess. Daher gibt es verschiedene Ansätze zur Erklärung dieses Phänomens. Zum einen können die zuvor genannten Zytokine auch von anderen Zelltypen sezerniert werden¹³⁰. Zum anderen kann es auch zu einer Ko-Stimulations-unabhängigen Aktivierung von Th17+ Zellen kommen. Revu *et al.*¹³¹ konnten bei *in vitro* Versuchen an menschlichen PBMCs nachweisen, dass Th17-Zellen nicht ausschließlich auf die CD28-Ko-Stimulation angewiesen sind sondern auch über die alternativen Aktivierungssignale IL-23 und IL-1 β stimuliert werden können. Außerdem

ist die Wirkung von Belatacept auf CD28-negative, also reife T-Zellen für deren Aktivierung gering, da diese nicht auf CD28-Ko-Stimulation angewiesen sind^{133,132,133}. Denkbar ist ebenfalls, dass die unvollständige Sättigung der CD80/CD86-Rezeptoren mit Belatacept, wie in der Studie von Latek *et al.*¹³⁴ dargestellt, eine CD28-Aktivierung auch unter Ko-Stimulationsblockade zulässt.

Insgesamt deutet unsere Studie im Einklang mit der aktuellen Datenlage darauf hin, dass die pro-inflammatorische Th17-Zellpopulation nach Umstellung auf Belatacept-Therapie nicht expandiert, sie sich im Vergleich zur Ausgangs-Immunsuppression unter CNI reduziert und so ein limitiertes inflammatorisches T-Zellprofil entsteht. Allerdings ist der Effekt von Belatacept bei CD28-negativen Zellen beschränkt und die T-Zellaktivierung kann auch über alternative Wege erfolgen. Eventuell sind in Zukunft Kombinationen mit anderen Pharmazeutika denkbar, welche die CD28-unabhängige T-Zellaktivierung wirksam unterbinden können¹³⁵. Gardner *et al.*¹³⁶ stellen die These auf, dass durch eine starke TZR-Aktivierung die Notwendigkeit der CD28-Ko-Stimulation überwunden werden kann. In Fällen, in denen eine Belatacept-resistente T-Zell-Aktivierung aufgrund einer starken TZR-Stimulierung auftritt, könnte der Einsatz von Vitamin-D3-Supplementierung die Wirksamkeit einer Behandlung mit Belatacept mit Hilfe der Hemmung der TZR-gesteuerten T-Zell-Proliferation verbessern¹³⁶.

4.1.4 IL-17A

Um zusätzlich zu der zytometrisch bestimmten Th17-Population die Freisetzung des Interleukins IL-17A in der Frühphase nach Belatacept-Konversion zu erfassen, führten wir bis Monat sechs der Studie IL-17A-ELISA-Testungen durch. Dies sollte uns Aufschluss über die Aktivität und Funktionalität der Th17-Zellen sowie über den inflammatorischen Immunstatus der Patienten geben¹³⁷. Wie zuvor erwähnt, spielt das Interleukin 17A eine wichtige Rolle in der Pathogenese von akuten und chronischen Nierenerkrankungen, wie auch von Abstoßungsreaktionen^{128,138}. In der Übersichtsarbeit von Chung *et al.*¹³⁹ über Th17-Zellen wird dargelegt, dass in Patienten mit chronischer Nierentransplantat-Dysfunktion, im Gegensatz zu stabilen nierentransplantierten Patienten, eine erhöhte Menge IL-17A im Blut zirkuliert. Die Wirkungen von IL-17A auf das Nierengewebe sind dabei vielfältig: es löst in proximalen Tubulus-Epithelzellen eine erhöhte Sekretion von IL-6 und IL-8 aus¹²⁵. Zusätzlich rekrutiert es zusammen mit TNF- α neutrophile Zellen in das Gewebe¹⁴⁰.

Nach den Ergebnissen der zuvor erörterten, peripher erfassten Th17-Zellen unserer Studie, wäre in Gruppe B1 parallel eine Abnahme der IL-17A Menge zu erwarten gewesen. Doch die gemessenen IL-17A-Konzentrationen spiegelten die nach Umstellung von CNI auf Belatacept abnehmende Th17-Anzahl nicht wider, sondern blieben konstant. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Th17-Zellen zwar numerisch dezimiert waren, ihre Sekretionsfähigkeit aber möglicherweise nicht unmittelbar beeinflusst wurde und andere T-Zellen ebenfalls IL-17A sezernierten¹³⁸. Ebenfalls widersprüchlich zu den zytometrisch erfassten konstanten Th17-Zellzahlen zeigte die mTORi-Studiengruppe B2 durchgängig erhöhte IL-17A-Werte. Diese Proben wurden gemeinsam mit den Proben der mTORi-Kontrollgruppe (K2) auf einer ELISA-Platte gemessen, wobei in der Kontrollgruppe keine erhöhten IL-17A-Werte gemessen wurden. Die Diskrepanz beruht demnach nicht auf einem Messfehler, steht aber auch nicht im Einklang mit den gemessenen Th17-Zellzahlen.

Bei einer Untersuchung von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) fanden Gonzalez-Orozco *et al.*¹⁴¹ ebenfalls erhöhte IL-17A-Serumspiegel ohne den parallelen Nachweis von vermehrt zirkulierenden Th17-(CD4+IL17A+) Zellen. Ihrer Hypothese nach sind die unter RA erhöhten IL-17A-positiven Neutrophilen unabhängig von den Th17-Zellen ursächlich für die Bildung des nachgewiesenen IL-17A. Dieser Erklärungsansatz könnte auch für die von uns gemessenen Werte gelten, allerdings werden unsere Messungen in einer begrenzten Studiengruppe durchgeführt, was den Einfluss von einzelnen Probanden-Werten erhöht. Auch lässt sich nicht argumentieren, dass in Gruppe B2 vermehrt Patienten mit Transplantat-Dysfunktion enthalten waren und damit, wie zuvor erläutert, erhöhte IL-17A Werte einhergingen, da die eGFR und der Albumin-Kreatinin-Quotient diese Annahme nicht widerspiegeln. Nach der Studie von Li *et al.*¹¹⁵ an nierentransplantierten Patienten waren unter mTORi-Immunsuppression niedrigere IL-17A-Werte im Vergleich zur CNI-Therapie zu erwarten. Begründet werden kann dies über die mTOR-abhängige Produktion von IL-17A über STAT3¹⁴², welche aufgrund der Hemmung dieser eher abnehmen sollte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass wir im Unterschied zur Anzahl der Th17-Zellen keinen Einfluss auf die periphere IL-17A Konzentration in den Konversionsgruppen im Verlauf feststellen konnten. Dementsprechend scheinen die Anzahl der Th17-Zellen und des u.a. von ihnen produzierten Zytokins IL-17A nicht direkt voneinander abhängig zu sein. Weitere Untersuchungen zu diesem Aspekt wären aus unserer Sicht

interessant, um die genaue Wirkung von Belatacept auf die IL-17A-produzierenden Zellen besser verstehen zu können.

4.1.5 Treg- Zellen

Regulatorische T-Zellen (Tregs) gelten als Schlüsselfiguren in der Prävention von Transplantatabstoßungen¹⁴³. Folglich ist die Aktivierung und Proliferation dieser Zelllinie unter Belatacept-Therapie ein wichtiger Faktor, um die Effizienz der Immunmodulation bewerten zu können. Dabei verbinden die zuvor diskutierten Th17- und die Treg-Zellen komplexe Interaktionen, wobei sich beide Zelltypen in Entwicklung und Funktion gegenseitig beeinflussen⁴¹. Unsere Analysen der Treg-Zellen (CD3+CD4+CD25+CD127low) im peripheren Blut zeigten in beiden Studiengruppen (B1 und B2), neun Monate nach Konversion auf Belatacept, eine signifikante Reduktion dieser Zellen.

Die Bindung von CD28 ist für die Förderung der Proliferation und der Effektor-Funktion von konventionellen T-Zellen entscheidend, ermöglicht aber auch gleichzeitig die entzündungshemmende Funktion von Treg-Zellen³⁵. Somit dient CD28 sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Zwecken, je nach Zelltyp und Kontext, in dem es exprimiert wird. Die CD28-Ko-Stimulation über CD80/CD86 greift in den Bestand und die Entwicklung der regulatorischen T-Zellen ein¹⁴⁴. Ihre Blockade über Belatacept kann, wie von uns beobachtet, zu einer Reduktion dieser Zellen führen. Übereinstimmend hiermit zeigten Studien zur Therapie mit Abatacept bei Patienten mit rheumatoider Arthritis ebenfalls die Abnahme peripherer Treg-Zellen im Verlauf^{145,146}. Allerdings spiegeln diese Untersuchungen nur die zirkulierenden, nicht aber die in das Transplantat migrierten Zellen wider. In Biopsien von stabilen nierentransplantierten Patienten zeigen sich unter Belatacept geringere Mengen von Treg-Zell-mRNA als unter CNI-Therapie¹¹³. Bei akuten Abstoßungsreaktionen dagegen konnten vermehrt Treg-Zellen in den Nierenbiopsien von Belatacept-Patienten im Vergleich zu CNI-Patienten nachgewiesen werden¹⁴⁷. Folglich wird die periphere Treg-Population unter der Ko-Stimulationsblockade in stabilen transplantierten Patienten eher dezimiert, aber in ihrer Funktion und Migrationsfähigkeit unter pro-inflammatorischen Bedingungen nicht gehemmt. Die Anreicherung von Tregs im Transplantat kann auf die verstärkte lokale Wirkung anti-inflammatorischer Zellen während der Abstoßung hinweisen und ist möglicherweise relevanter als die periphere Treg-Konzentration. Zusätzlich ist natürlich auch die immunsuppressive Kapazität der Tregs ein wichtiger Faktor bei der Betrachtung der Pharmakomodulation der T-Zellen unter Belatacept. In der zuvor erwähnten Studie von Álvarez-Quiroga *et al.*^{145,146} konnte

gezeigt werden, dass, obwohl die Anzahl der Tregs *in vivo* unter Abatacept vermindert wurde, ihre regulatorische Funktion signifikant erhöht war.

Um die Aktivierung der regulatorischen T-Zellen in unserer Studie zu verfolgen, analysierten wir zusätzlich die CCR4-positiven, aktivierten Treg-Zellen⁴⁸. Hier zeigte sich in Gruppe B2 eine Abnahme der aktivierten Tregs (aTreg), die allerdings knapp keine Signifikanz erreichte. Im Vergleich mit der korrespondierenden Kontrollgruppe (K2) kam es zu einer signifikanten Reduktion der aTregs in der auf Belatacept umgestellten Gruppe nach einem Jahr. Parallele Tendenzen wurden in Gruppe B1 nicht gefunden. Zu erwarten gewesen wäre eine Reduktion der aTregs unter der Ko-Stimulationsblockade in beiden Belatacept-Konversionsgruppen entsprechend der klinischen Studie von Glatigny *et al.*¹⁴⁸ bei Patienten unter Abatacept-Therapie. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass naive Tregs auch unabhängig von der CD28-Ko-Stimulation aktiviert werden können¹⁴⁹. Insgesamt lässt sich zwar eine Abnahme der zirkulierenden Tregs unter Belatacept-Therapie in Gruppe B1 beobachten, die aktivierten Tregs nahmen im Verlauf jedoch nicht ab. Ob die Expression dieser peripheren Zellen als prognostischer Marker bei stabilen nierentransplantierten Patienten aussagekräftig ist, oder ob eher die in das Gewebe migrierten Tregs bei Entzündungsreaktionen eine Aussage über ihre hemmende Immunmodulation treffen lassen, ist eine wichtige Fragestellung für die weitere Forschung.

Eventuell ist die Kombination mit weiteren Pharmaka ein Weg, um auch unter der Ko-Stimulationsblockade den regulativen Effekt der Tregs auf die Effektor-Zellen nutzen zu können. So konnten Bestard *et al.*¹⁵⁰ in einer kleinen Patientengruppe zeigen, dass die Kombination aus T-Zell-Depletion, mTOR-Inhibition und Ko-Stimulations-Blockade das Überleben der Tregs ermöglicht, ohne ihre suppressiven Eigenschaften zu hemmen. Ein weiterer interessanter Ansatz, um den Effekt von Belatacept auf die Tregs auszugleichen, ist die Entwicklung von Tregs als Therapeutikum, wie sie in der ONE-Studie von Sawitzki *et al.*¹⁵¹ zur Anwendung kam. Leider konnte in dieser Studie die Rejektionsrate durch den Einsatz von Tregs nicht reduziert werden. Dennoch birgt die Zelltherapie mit Tregs in Zukunft möglicherweise vielversprechende Ansätze⁵⁶.

4.1.6 Th17/Treg Ratio

Wie bereits erwähnt, stehen Th17- und Treg-Population in enger Verbindung zueinander. Die Reifung erfolgt aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, die durch das vorherrschende Zytokin-Milieu beeinflusst wird. Pro-inflammatorische Zytokine führen zu einer

vermehrten Proliferation der Th17-Zellen und damit zu einer Verschiebung der Th17/Treg Ratio im Sinne einer entzündungsfördernden Umgebung. So wurde bei akuten Abstoßungsreaktionen eine vermehrte Anzahl von Th17-Zellen und eine verminderte Anzahl von Treg-Zellen beobachtet^{152,153}. Demzufolge ist bei stabiler Transplantatfunktion eine beständige Th17/Treg Ratio zu erwarten¹⁵⁴. Die Plastizität der Entwicklung beider Zelltypen macht diese Ratio besonders interessant, da pharmakologische Eingriffe das Potential haben, die Balance zu verschieben^{155,156}. Eine erhöhte Ratio kann auf ein entzündliches Geschehen bzw. eine Rejektion hindeuten, eine erniedrigte Ratio dagegen auf Toleranz sowie die Hemmung der T-Effektor-Reaktionen in der Peripherie^{115,153}.

In unseren Ergebnissen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Th17/Treg Ratio bis zu einem Jahr nach Konversion auf Belatacept. In beiden Konversionsgruppen war nach Umstellung unter Ko-Stimulationsblockade eine Reduktion beider Zell-Typen zu erkennen. Dementsprechend wirkt Belatacept offenbar gleichermaßen hemmend auf Th17- und auf Treg-Zellen, so dass die Ratio unverändert bleibt. Angesichts der Tatsache, dass unsere nierentransplantierten Studienpatienten vor Konversion stabil waren und im Untersuchungszeitraum keine Rejektionen auftraten, kann dies als positives Signal gewertet werden.

4.1.7 CD3+CD8+ Subpopulationen

Unmittelbar nach Transplantation können zytotoxische CD8+ T-Zellantworten, vermittelt über CD4+-Zellen und die Präsentation von MHC-Klasse-I-Alloantigenen erzeugt werden¹⁵⁷. Inwieweit diese Aktivierung alloreaktiver CD8+ T-Zellzytotoxizität einen Anteil an der späten Entstehung von Transplantatabstoßungen hat, ist noch nicht ausreichend belegt¹⁵⁸. Yap *et al.*¹⁵⁹ fanden allerdings bei der Langzeit-Beobachtung von nierentransplantierten Patienten einen Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten einer Transplantatdysfunktionen und einer erhöhten Anzahl von zirkulierenden, "terminal differenzierten" Effektor-Gedächtnis CD8+ T-Zellen (T_{EMRA}). Diese Zellpopulation fördert die Entstehung von Entzündungsreaktionen über zytotoxische Prozesse und die Sekretion eines breiten Spektrums pro-inflammatorischer Zytokine nach spenderspezifischer Stimulation¹⁶⁰. Die Studie von Jacquemont *et al.*¹⁶⁰ konnte zeigen, dass T_{EMRA} CD8+ T-Zellen klinisch eine zentrale Rolle bei der humoralen und zellulären Rejektion spielen und ihre Zunahme im peripheren Blut ein Marker für das erhöhte Risiko eines Transplantatversagens ist.

Der Einfluss der CD28-Ko-Stimulationsblockade auf die CD3+CD8+ Zellen ist, wie in der Einleitung erörtert, aufgrund von zwei Eigenschaften dieser Population reduziert: zum einen exprimiert nur die Hälfte der CD8+ Zellen das CD28-Molekül auf ihrer Oberfläche²⁰, zum anderen ist der altersabhängige Verlust von CD28 in diesen Zellen verstärkt³⁵. Im Rahmen unserer Studie stellten wir dementsprechend keine Veränderungen der CD3+CD8+ Zellen sowie ihrer funktionellen Untergruppen fest. Auch das Verhältnis zwischen den CD4+ und CD8+ Zellen blieb konstant.

Interessanterweise konnten Mathews *et al.*¹⁶¹ im Tiermodell einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahl von peripheren CD8+CD28+ Zellen vor Transplantation und einem vermehrten Auftreten von Rejektionen unter Belatacept belegen. Die Autoren spekulieren, dass diese CD8-Zellen resistent gegenüber der Ko-Stimulationsblockade sind und auch nach Verlust ihrer CD28-Expression ihre Effektor-Funktion beibehalten können. Diese These wird von Biopsie-Analysen von nierentransplantierten Patienten unter Belatacept-Therapie gestützt, in denen bei akuten Rejektionen vermehrt CD8-assoziierte Proteine nachgewiesen wurden¹⁶². Einen möglichen, CD28-unabhängigen Aktivierungsweg für die CD8-Zellen zeigen Jacquemont *et al.*¹⁶⁰ in ihrer *in vitro* Studie auf. Sie vermuten, dass T_{EMRA} CD8-Zellen zum Transplantat migrieren, wo ihre Aktivierung durch HLA-Antigene des Spenders über den TZR und die Aktivierung des CD16-Signalwegs erfolgt. Dadurch wird die Induktion einer anhaltenden entzündlichen Mikro-Umgebung, einschließlich endothelialer Aktivierung, begünstigt.

Ein interessanter Ansatz gegen die Entwicklung einer Ko-Stimulations-unabhängigen Rejektion basiert auf der Blockierung von CD122, einer Untereinheit des IL-2-Rezeptors. Eine Blockade dieses Aktivierungsweges konnte im Tiermodell eine verbesserte Transplantatakzeptanz über eine verminderte Proliferation und Funktion von CD8+ Memory Zellen bewirken¹⁶³. Eine Kombination von Belatacept und CD122-Blockade könnte daher eventuell eine Lösung für die Behandlung von CD8+ T-Zell-vermittelten ko-Stimulationsunabhängigen Abstoßungsreaktionen sein.

Insgesamt ließ sich in unserer Studie bei stabilen Transplantatempfängern keine Beeinflussung der CD8+ T-Zellen nach Umstellung auf Belatacept feststellen. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass diese Zellen beim Rejektionsgeschehen unter Belatacept unzureichend gehemmt werden und so die Immunreaktion gegen das Spenderorgan unterstützen können.

4.2 Einfluss der Ko-Stimulationsblockade auf die klinischen Parameter

Um den Einfluss von Belatacept auf die Transplantatfunktion zu untersuchen, analysierten wir die eGFR und die Albuminurie (Albumin/Kreatinin-Quotient).

Hauptgrund für die Umstellung der Studienpatienten auf Belatacept war in Gruppe B1 die CNI-induzierte Nephrotoxizität. Dementsprechend waren die Ausgangs-eGFR-Werte in Gruppe B1 relativ niedrig. Nach Umstellung auf Belatacept stieg die eGFR signifikant an, wie schon in der Konversionsstudie von Rostaing *et al.*¹⁶⁴ beschrieben. In den wegweisenden Studien über die klinische Effektivität von Belatacept (BENEFIT^{84,86} und BENEFIT-EXT^{85,87,89}) wurden ebenfalls bessere Nierenfunktionswerte (GFR) im Vergleich zu Patienten unter CNI-Therapie festgestellt. Die Albuminurie änderte sich in beiden Gruppen nicht wesentlich. Lediglich in Gruppe B1 kam es zu einem diskreten, im Monat sechs auch signifikanten Anstiegs des Albumin-Kreatinin-Quotienten. Interessant in diesem Zusammenhang ist eine Studie von Shuai *et al.*¹⁶⁵, in der eine im Mausmodell induzierte Proteinurie durch Abatacept verringert werden konnte. Die Autoren wiesen dabei auf die negative Korrelation zwischen Proteinurie und zirkulierenden Tregs sowie die positive Korrelation zwischen Proteinurie und IL-17-Konzentration im Plasma hin.

Insgesamt ist der Ansatz, nach Transplantation zunächst eine CNI-basierte Induktionstherapie durchzuführen und zu einem späteren Zeitpunkt auf eine Therapie mit Belatacept umzustellen, vielversprechend¹⁶⁶. Hiermit könnte einerseits das Auftreten von frühen akuten Rejektionen unter Belatacept vermieden und andererseits der langfristigen Entwicklung einer CNI-Nephrotoxizität entgegengewirkt werden. Im Vergleich dazu führt ein später Wechsel von CNI auf mTORi, wie die ASCERTAIN-Studie zeigt, nicht zu einer Verbesserung der GFR bei Patienten mit eingeschränkter Transplantatfunktion¹⁶⁷. Folglich scheint die Umstellung auf Belatacept bei Patienten mit beginnender oder etablierter CNI-Toxizität erfolgversprechender zu sein als die Umstellung auf mTORi.

Der positive Einfluss auf die Transplantatfunktion nach Umstellung auf Belatacept zeigte sich in unserer Studie ausschließlich an der eGFR in der CNI-vorbehandelten Gruppe B1. Die eGFR in Gruppe B2 und die Albuminurie in beiden Gruppen blieben unverändert. Die Ergebnisse der 2016 von Brakemeier *et al.*¹⁶⁸ mit einer größeren Patientengruppe durchgeführten Studie stimmen mit unseren Ergebnissen nicht voll überein. Hier kam es durch die Rescue-Therapie mit Belatacept zu einer Steigerung der GFR innerhalb eines Jahres nach Umstellung sowohl bei CNI- als auch bei mTORi-Patienten.

Wichtig zu erwähnen ist, dass es im Rahmen unserer Studie in den ersten 12 Monaten in keiner der Studien- oder Kontrollgruppen zu Todesfällen oder Transplantatversagen

kam. Langfristig beobachteten wir in Gruppe B1 keine Transplantatverluste und keine Todesfälle. Im Vergleich dazu kam es in Gruppe K1 nach vier Jahren zu einem Todesfall und zwei Transplantatverlusten. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte die BENEFIT-Studie⁸⁸ nach sieben Jahren ein reduziertes Risiko für Tod und Transplantatverlust unter einem Belatacept-Regime im Vergleich zu einem CNI-Regime. In der BENEFIT-EXT-Studie⁸⁹ zeigte sich diesbezüglich kein Unterschied.

In der mTORi-Kontrollgruppe (K2) traten in sieben Jahren keine Transplantatverluste oder Todesfälle auf. Demgegenüber traten in Gruppe B2 dagegen zwei Transplantatverluste, nach zwei und nach fünf Jahren auf. Ein Patient dieser Gruppe verstarb drei Jahre nach Studienbeginn. Die Einordnung dieser Beobachtungen ist aufgrund fehlender klinischer Studien über die Konversion von mTORi-Medikation auf Belatacept erschwert.

4.3 Stärken und Limitationen der Studie

Unser Studiendesign zeichnet sich durch die engmaschige, prospektive Kontrolle der klinischen und immunologischen Parameter aus. Das Matching der Kontrollpatienten wurde sorgfältig durchgeführt, um auch bei geringer Probandenzahl möglichst homogene Patientengruppen vergleichen zu können. Aufgrund der relativ kleinen Gruppengröße ist die Aussagekraft unserer Ergebnisse naturgemäß eingeschränkt. Angesichts der bislang vorliegenden geringen Anzahl publizierter Daten zu dieser immunologischen Thematik, insbesondere zur Umstellung von mTORi-Patienten auf Belatacept, ist die Studie jedoch durchaus relevant.

Die von uns untersuchten T-Zell-Populationen stehen im Verhältnis zur Lymphozyten-Gesamtpopulation nur im einstelligen Prozentbereich. Wir entschieden uns bei der Angabe unserer Ergebnisse daher für die Darstellung in absoluten Zahlen, ermittelt aus der Gesamtzahl der Lymphozyten und dem Prozentwert der einzelnen Zelllinien. Die Lymphozyten-Zahl und -Zusammensetzung unterliegen neben der immunsuppressiven Medikation vielen anderen Einflussfaktoren, wie z.B. zusätzliche Ko-Medikation und Begleiterkrankungen. Dementsprechend können die von uns ermittelten Veränderungen der T-Zell-Populationen nicht ausschließlich auf die Konversion der immunsuppressiven Medikation zurückgeführt werden, spiegeln jedoch die zirkulierenden Zellen am realistischsten wider. Auch aus diesem Grund ist der Vergleich mit den Kontrollgruppen unter unveränderter Ausgangsmedikation ein wichtiger Bestandteil des Studiendesigns. Insgesamt wird die Untersuchung von Patienten unter Langzeit-Immunsuppression durch

andere Faktoren beeinflusst als die Untersuchung von *de novo* transplantierten Patienten. Dennoch sind besonders auch diese Studien aussagekräftig und wichtig, weil sie den Verlauf der klinischen Realität widerspiegeln, in dem pharmakologisch alle Ressourcen ausgeschöpft werden müssen, um Patienten- und Transplantat-Überleben so gut und so lange wie möglich zu erhalten.

Bei der Färbung und dem Gating der Zellpopulationen orientierten wir uns an dem "*Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project*" von Mackers *et al.*³¹, um unsere Ergebnisse standardisiert wiedergeben zu können. Allerdings wären eventuell auch zusätzliche Marker aufschlussreich für die Darstellung der Wirkung von Belatacept gewesen. In der Praxis gibt es in den meisten Studien unterschiedlichste Ansätze für die Definition von Zellpopulationen mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern. In der Konsequenz sind die Ergebnisse von anderen Studien aufgrund der alternativen Abgrenzung der T-Zell-Subpopulationen und der Angabe der Ergebnisse als prozentualer Anteil nicht vollständig auf unsere Beobachtungen übertragbar.

Zusammenfassend widmeten wir uns in dieser Studie einem Kollektiv stabiler Langzeit-transplantierten Patienten und untersuchten den späten Wechsel auf die Ko-Stimulations-Blockade auf zellulärer Ebene, um die zugrunde liegenden immunologischen Vorgänge besser verstehen zu können. Da es sich in dieser Analyse nur um eine relativ kleine Patientengruppe handelte, wählten wir Kontrollpatienten und Nachweisverfahren sorgfältig aus, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu maximieren. Natürlich sind unsere Erkenntnisse dennoch nur als hinweisgebend zu betrachten. In Zukunft sind sicherlich größer angelegte Studien erforderlich, um die T-Zellveränderungen unter Belatacept noch besser entschlüsseln zu können.

Literaturverzeichnis

1. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2019. 2019. (<https://dso.de/SiteCollectionDocuments/DSO-Jahresbericht%202019.pdf>). Abgerufen 01.01.2020
2. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;341(23):1725-30.
3. Waiser J, Budde K, Schreiber M, Peibst O, Koch U, Böhler T, Höffken B, Hauser I, Neumayer HH. The quality of life in end stage renal disease care. *Transpl Int* 1998;11 (Suppl 1):S42-5.
4. Landreneau K, Lee K, Landreneau MD. Quality of life in patients undergoing hemodialysis and renal transplantation--a meta-analytic review. *Nephrol Nurs J* 2010;37(1):37-44.
5. Axelrod DA, Schnitzler MA, Xiao H, Irish W, Tuttle-Newhall E, Chang SH, Kasiske BL, Alhamad T, Lentine KL. An economic assessment of contemporary kidney transplant practice. *Am J Transplant* 2018;18(5):1168-76.
6. Klein F, Pratschke J, Öllinger R. Nierentransplantation – aktueller Stand und Probleme. *Allgemein- und Viszeralchirurgie update* 2017;11(4):393-411.
7. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2017. 2017. (https://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/JB_2017_web_01.pdf). Abgerufen 01.01.2020
8. Hatzinger M, Stastny M, Grützmaker P, Sohn M. Die Geschichte der Nierentransplantation. *Urologe A* 2016;55(10):1353-9.
9. Druml W. The beginning of organ transplantation: Emerich Ullmann (1861-1937). *Wien Klin Wochenschr* 2002;114(4):128-37.
10. Watson CJE, Dark JH. Organ transplantation: historical perspective and current practice. *Br J Anaesth* 2012;108(Suppl 1):i29-42.
11. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat* 1943;77(4):299-310.
12. Merrill JP, Murray JE, Harrison J, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *JAMA* 1956;160(4):277-82.
13. Adenwalla HS, Bhattacharya S. Dr. Joseph E. Murray. *Indian J Plast Surg* 2012;45(3):596-7.

14. Brosig W, Nagel R. Clinical problems of kidney transplantations in humans. *Urologe* 1965;4:1-8.
15. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol* 1958;20(4):156-66.
16. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978;312(8104):1323-7.
17. Hoffman AL, Makowka L, Banner B, Cai X, Cramer DV, Pascualone A, Todo S, Starzl TE. The use of FK-506 for small intestine allotransplantation. Inhibition of acute rejection and prevention of fatal graft-versus-host disease. *Transplantation* 1990;49(3):483-90.
18. Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen. Nierentransplantation Qualitätsindikatoren und Kennzahlen. Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2019 2020. (https://iqtig.org/downloads/auswertung/2019/ntx/QSKH_NTX_2019_BUAW_V02_2020-07-14.pdf). Abgerufen 01.01.2021
19. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. *Roitt's Essential Immunology eBook*. 13th ed: John Wiley & Sons; 2017:541.
20. Esensten J, Helou Y, Chopra G, Weiss A, Bluestone J. CD28 costimulation: From mechanism to therapy. *Immunity* 2016;44(5):973-88.
21. Yeung MY, Najafian N, Sayegh MH. Targeting CD28 to prevent transplant rejection. *Expert Opin Ther Targets* 2014;18(2):225-42.
22. Shahinian A, Pfeffer K, Lee K, Kundig T, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi P, Thompson C, Mak T. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993;261(5121):609-12.
23. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7–CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116-26.
24. Adams AB, Ford ML, Larsen CP. Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation: The CD28 pathway. *J Immunol* 2016;197(6):2045-50.
25. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LSK, Sansom DM. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011;332(6029):600-3.
26. Malvezzi P, Jouve T, Rostaing L. Costimulation blockade in kidney transplantation: An update. *Transplantation* 2016;100(11):2315-23.
27. Gupta G, Womer KL. Profile of belatacept and its potential role in prevention of graft rejection following renal transplantation. *Drug Des Devel Ther* 2010;4:375-82.

28. IUIS-WHO. Nomenclature for clusters of differentiation (CD) of antigens defined on human leukocyte populations. *Bull World Health Organ* 1984;62(5):809-15.
29. Alarcón B, Swamy M, van Santen HM, Schamel WW. T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity. *EMBO Rep* 2006;7(5):490-505.
30. RKI. Bedeutung der Bestimmung von Lymphozyten-Subpopulationen in der Umweltmedizin. *Bundesgesundheitsblatt, Robert-Koch-Institut; Kommission Umweltmedizin* 2006;49(5):468-84.
31. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012;12(3):191-200.
32. Jameson SC, Masopust D. Diversity in T Cell memory: An embarrassment of riches. *Immunity* 2009;31(6):859-71.
33. Mou D, Espinosa J, Lo DJ, Kirk AD. CD28 negative T cells: is their loss our gain? *Am J Transplant* 2014;14(11):2460-6.
34. Boesteanu AC, Katsikis PD. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Semin Immunol* 2009;21(2):69-77.
35. Boucher N, Dufeu-Duchesne T, Vicaut E, Farge D, Effros RB, Schächter F. CD28 expression in T cell aging and human longevity. *Exp Gerontol* 1998;33(3):267-82.
36. Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. *Mediators inflamm. Hindawi Publishing Corporation. (ePub Review) (<https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/3908061/>)* Abgerufen 01.01.2021
37. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res* 2011;317(5):620-31.
38. Yamamoto J, Adachi Y, Onoue Y, Adachi YS, Okabe Y, Itazawa T, Toyoda M, Seki T, Morohashi M, Matsushima K, Miyawaki T. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2000;68(4):568-74.
39. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6(11):1123-32.
40. Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene* 2017;614:8-14.
41. Lochner M, Wang Z, Sparwasser T. The special relationship in the development and function of T helper 17 and regulatory T cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;136:99-129.
42. Singh SP, Zhang HH, Foley JF, Hedrick MN, Farber JM. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol* 2008;180(1):214-21.

43. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203(7):1701-11.
44. Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, Li M, Leng X, Li X. CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *J Inflamm* 2012;35(6):1773-80.
45. Dummer CD, Carpio VN, Goncalves LF, Manfro RC, Veronese FV. FOXP3⁺ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transpl Immunol* 2012;26(1):1-10.
46. Wilczynski JR, Radwan M, Kalinka J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci* 2008;13:2266-74.
47. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Cellular and molecular immunology E-Book. 9th ed: Elsevier Health Sciences, 2018.
48. Baatar D, Olkhanud P, Sumitomo K, Taub D, Gress R, Biragyn A. Human peripheral blood T regulatory cells (Tregs), functionally primed CCR4 Tregs and unprimed CCR4 Tregs, regulate effector T cells using FasL. *J Immunol* 2007;178(8):4891-900.
49. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2001;194(6):847-53.
50. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133(5):775-87.
51. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DTW, Hahn BH, Hossain A. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2014;13(12):1174-81.
52. Xin C, J. OJ. Th17 cells and Tregs: unlikely allies. *J Leukoc Biol* 2014;95(5):723-31.
53. Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, Lawson DH, Ford ML. Balancing inflammation: The link between Th17 and regulatory T cells. *Mediators Inflamm*. Hindawi Publishing Corporation. (ePub Review) (<https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/6309219/>) Abgerufen 01.01.2021
54. Chaudhry A, Samstein R M, Treuting P, Liang Y, Pils M C, Heinrich J-M, Jack R S, Wunderlich FT, Brünig J C, Müller W, Rudensky A Y. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 2011;34(4):566-78.
55. Barbi J, Pardoll D, Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol Rev* 2013;252(1):52-77.

56. Tang Q, Vincenti F. Transplant trials with Tregs: perils and promises. *J Clin Invest* 2017;127(7):2505-12.
57. Kumbala D, Zhang R. Essential concept of transplant immunology for clinical practice. *World J Transplant* 2013;3(4):113-8.
58. Danovitch GM. *Handbook of kidney transplantation*. 5th ed: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
59. Mai J, Virtue A, Shen J, Wang H, Yang X-F. An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells. *J Hematol Oncol* 2013;6:61.
60. Bhatti AB, Usman M. Chronic renal transplant rejection and possible anti-proliferative drug targets. *Cureus* 2015;7(11):e376.
61. Sanchez–Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology* 2011;140(1):51-64.
62. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, Loupy A, Mengel M, Perkowska-Ptasińska A, Rabant M, Racusen LC, Solez K, Becker JU. A 2018 reference guide to the Banff classification of renal allograft pathology. *Transplantation* 2018;102(11):1795-814.
63. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, Castro MC, David DS, David-Neto E, Bagnasco SM, Cendales LC, Cornell LD, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Farris AB, 3rd, Gibson IW, Kraus E, Liapis H, Loupy A, Nickleit V, Randhawa P, Rodriguez ER, Rush D, Smith RN, Tan CD, Wallace WD, Mengel M. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014;14(2):272-83.
64. van Sandwijk MS, Bemelman FJ, Ten Berge IJ. Immunosuppressive drugs after solid organ transplantation. *Neth J Med* 2013;71(6):281-9.
65. KDIGO. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work Group: Clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients*. *Am J Transplant* 2009;9 (Suppl 3):S1-155.
66. Beimler J, Morath C, Zeier M. Modern immunosuppression after solid organ transplantation. *Internist* 2014;55(2):212-22.
67. Lim MA, Kohli J, Bloom RD. Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? *Transplant Rev* 2017;31(1):10-7.
68. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Rang & Dale's Pharmacology*. 7th ed: Elsevier Health Sciences UK, 2011.
69. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992;357(6380):695-7.

70. Waiser J, Dell K, Böhler T, Dogu E, Gaedeke J, Budde K, Neumayer HH. Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF- β 1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(9):1568-77.
71. Waiser J, Dell K, Kreutzkamp J, Böhler T, Budde K, Peters H, Neumayer HH. FK506, transforming growth factor-beta1 and mesangial matrix synthesis: parallels and differences compared with cyclosporine A. *Cytokine* 2006;33(2):59-65.
72. Kopp JB, Klotman PE. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1990;1(2):162-79.
73. Rath T. Tacrolimus in transplant rejection. *Expert Opin Pharmacother* 2013;14(1):115-22.
74. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyó JM, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloz P, Halloran PF. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007;357(25):2562-75.
75. Mele TS, Halloran PF. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology* 2000;47(2-3):215-45.
76. Wagner M, Earley AK, Webster AC, Schmid CH, Balk EM, Uhlig K. Mycophenolic acid versus azathioprine as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* (ePub Review) (<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD007746.pub2/full>) Abgerufen 01.01.2021
77. Gabardi S, Tran JL, Clarkson MR. Enteric-coated mycophenolate sodium. *Ann Pharmacother* 2003;37(11):1685-93.
78. Ventura-Aguiar P, Campistol JM, Diekmann F. Safety of mTOR inhibitors in adult solid organ transplantation. *Expert Opin Drug Saf* 2016;15(3):303-19.
79. Montero N, Quero M, Melilli E, Pérez-Sáez MJ, Redondo-Pachón D, Bestard O, Crespo M, Cruzado JM, Pascual J. Mammalian target of rapamycin inhibitors combined with calcineurin inhibitors as initial immunosuppression in renal transplantation: A meta-analysis. *Transplantation* 2019;103(10):2031-56.
80. Lim WH, Eris J, Kanellis J, Pussell B, Wiid Z, Witcombe D, Russ GR. A systematic review of conversion from calcineurin inhibitor to mammalian target of rapamycin inhibitors for maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2014;14(9):2106-19.
81. Liefeldt L, Brakemeier S, Glander P, Waiser J, Lachmann N, Schönemann C, Zukunft B, Illigens P, Schmidt D, Wu K, Rudolph B, Neumayer HH, Budde K. Donor-specific HLA antibodies in a cohort comparing everolimus with cyclosporine after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2012;12(5):1192-8.
82. Vincenti F, Dritselis A, Kirkpatrick P. Belatacept. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:655-6.

83. Perez CP, Patel N, Mardis CR, Meadows HB, Taber DJ, Pilch NA. Belatacept in solid organ transplant: Review of current literature across transplant types. *Transplantation* 2018;102(9):1440-52.
84. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P, Massari P, Mondragon-Ramirez GA, Agarwal M, Di Russo G, Lin CS, Garg P, Larsen CP. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant* 2010;10(3):535-46.
85. Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, Vincenti F, Garcia VD, Campistol J, Rial Mdel C, Florman S, Block A, Di Russo G, Xing J, Garg P, Grinyo J. A phase III study of belatacept versus cyclosporine in kidney transplants from extended criteria donors (BENEFIT-EXT study). *Am J Transplant* 2010;10(3):547-57.
86. Vincenti F, Larsen CP, Alberu J, Bresnahan B, Garcia VD, Kothari J, Lang P, Urrea EM, Massari P, Mondragon-Ramirez G, Reyes-Acevedo R, Rice K, Rostaing L, Steinberg S, Xing J, Agarwal M, Harler MB, Charpentier B. Three-year outcomes from BENEFIT, a randomized, active-controlled, parallel-group study in adult kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2012;12(1):210-7.
87. Pestana JO, Grinyo JM, Vanrenterghem Y, Becker T, Campistol JM, Florman S, Garcia VD, Kamar N, Lang P, Manfro RC, Massari P, Rial MD, Schnitzler MA, Vitko S, Duan T, Block A, Harler MB, Durrbach A. Three-year outcomes from BENEFIT-EXT: a phase III study of belatacept versus cyclosporine in recipients of extended criteria donor kidneys. *Am J Transplant* 2012;12(3):630-9.
88. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaitte L, Moal M-C, Mondragon-Ramirez GA, Kothari J, Polinsky MS, Meier-Kriesche H-U, Munier S, Larsen CP. Belatacept and long-term outcomes in kidney transplantation. *N Engl J Med* 2016;374(4):333-43.
89. Durrbach A, Pestana JM, Florman S, Del Carmen Rial M, Rostaing L, Kuypers D, Matas A, Wekerle T, Polinsky M, Meier-Kriesche HU, Munier S, Grinyo JM. Long-term outcomes in belatacept- versus cyclosporine-treated recipients of extended criteria donor kidneys: Final results from BENEFIT-EXT, a phase III randomized study. *Am J Transplant* 2016;16(11):3192-201.
90. Bray RA, Gebel HM, Townsend R, Roberts ME, Polinsky M, Yang L, Meier-Kriesche HU, Larsen CP. De novo donor-specific antibodies in belatacept-treated vs cyclosporine-treated kidney-transplant recipients: Post hoc analyses of the randomized phase III BENEFIT and BENEFIT-EXT studies. *Am J Transplant* 2018;18(7):1783-9.
91. Pajenda S, Böhming GB. CNI-freie Immunsuppression – Belatacept in der Nierentransplantation. *Nephro Script Österreichische Gesellschaft für Nephrologie* 2016;03:24-9.
92. Schröter K, Lindemann - v.Trzebiatowski G, Fritsche L. TBase2 - a web-based electronic patient record. *Fundam Inf* 2000;43(1-4):343-53.

93. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Clark G, Drbal K, Engel P, Hart D, Horejsí V, Isacke C, Macardle P, Malavasi F, Mason D, Olive D, Saalmueller A, Schlossman SF, Schwartz-Albiez R, Simmons P, Tedder TF, Uguccioni M, Warren H. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* 2005;106(9):3123-6.
94. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150(9):604-12.
95. Tukey JW. *Exploratory Data Analysis* 1 ed: Addison-Wesley Publishing Company, 1977.
96. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 2003;3(12):939-51.
97. Malvezzi P, Fischman C, Rigault G, Jacob MC, Raskovalova T, Jouve T, Janbon B, Rostaing L, Cravedi P. Switching renal transplant recipients to belatacept therapy: results of a real-life gradual conversion protocol. *Transpl Immunol.* (ePub Research) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966327419300231>) Abgerufen 01.01.2021
98. Waickman AT, Powell JD. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. *Immunol Rev* 2012;249(1):43-58.
99. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013;13(4):227-42.
100. Su CA, Fairchild RL. Memory T cells in transplantation. *Curr Transplant Rep* 2014;1(3):137-46.
101. Ndejemi MP, Teijaro JR, Patke DS, Bingaman AW, Chandok MR, Azimzadeh A, Nadler SG, Farber DL. Control of memory CD4 T cell recall by the CD28/B7 costimulatory pathway. *J Immunol* 2006;177(11):7698-706.
102. Page AJ, Ford ML, Kirk AD. Memory T-cell-specific therapeutics in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14(6):643-9.
103. de Graav GN, Hesselink DA, Dieterich M, Kraaijeveld R, Weimar W, Baan CC. Down-regulation of surface CD28 under belatacept treatment: An escape mechanism for antigen-reactive T-cells. *PLoS One.* (ePub Research) (<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0148604>) Abgerufen 01.01.2021
104. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004;22:745-63.
105. Chen S, Liu D, Wu J, Xu B, Lu K, Zhu W, Chen M. Effect of inhibiting the signal of mammalian target of rapamycin on memory T cells. *Transplant Proc* 2014;46(5):1642-8.

106. Eichmann M, Baptista R, Ellis RJ, Heck S, Peakman M, Beam CA. Costimulation blockade disrupts CD4+ T cell memory pathways and uncouples their link to decline in β -cell function in type 1 diabetes. *J Immunol* 2020;204(12):3129-38.
107. Betjes MG. Clinical consequences of circulating CD28-negative T cells for solid organ transplantation. *Transpl Int* 2016;29(3):274-84.
108. Shurin MR, Lu L, Kalinski P, Stewart-Akers AM, Lotze MT. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* 1999;21(3):339-59.
109. Nocera A, Tagliamacco A, De Palma R, Del Galdo F, Ferrante A, Fontana I, Barocci S, Ginevri F, Rolla D, Ravetti JL, Valente U. Cytokine mRNA expression in chronically rejected human renal allografts. *Clin Transplant* 2004;18(5):564-70.
110. Liu Z, Fan H, Jiang S. CD4(+) T-cell subsets in transplantation. *Immunol Rev* 2013;252(1):183-91.
111. Obata F, Yoshida K, Ohkubo M, Ikeda Y, Taoka Y, Takeuchi Y, Shinohara N, Endo T, Baba S. Contribution of CD4+ and CD8+ T cells and interferon-gamma to the progress of chronic rejection of kidney allografts: the Th1 response mediates both acute and chronic rejection. *Transpl Immunol* 2005;14(1):21-5.
112. Sabet-Baktach M, Eggenhofer E, Renner P, Lantow M, Rovira J, Schlitt H, Geissler E, Kroemer A. Th1- but not Th17- and Th2-mediated alloimmune responses are responsive to costimulatory blockade. *Transplantation* 2014;98(Suppl 3):S313.
113. Grimbert P, Audard V, Diet C, Matignon M, Plonquet A, Mansour H, Desvaux D, Durrbach A, Cohen JL, Lang P. T-cell phenotype in protocol renal biopsy from transplant recipients treated with belatacept-mediated co-stimulatory blockade. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(3):1087-93.
114. Chung BH, Oh HJ, Piao SG, Sun IO, Kang SH, Choi SR, Park HS, Choi BS, Choi YJ, Park CW, Kim YS, Cho ML, Yang CW. Higher infiltration by Th17 cells compared with regulatory T cells is associated with severe acute T-cell-mediated graft rejection. *Exp Mol Med* 2011;43(11):630-7.
115. Li Y, Shi Y, Huang Z, Bai Y, Niu Q, Cai B, Wang L, Feng W. CNI induced Th17/Treg imbalance and susceptibility to renal dysfunction in renal transplantation. *Int Immunopharmacol* 2011;11(12):2033-8.
116. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank Rebecca B, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'Shea John J. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007;26(3):371-81.
117. Vondran FWR, Timrott K, Kollrich S, Klempnauer J, Schwinzer R, Becker T. Decreased frequency of peripheral CD4+CD161+ Th17-precursor cells in kidney transplant recipients on long-term therapy with belatacept. *Transpl Int* 2012;25(4):455-63.

118. Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Alberú J, Palafox D, Uribe-Uribe N, Morales-Buenrostro LE, Reyes Acevedo R, Mondragón G, Chevaile A, Llorente L. Infiltrating cellular pattern in kidney graft biopsies translates into forkhead box protein 3 up-regulation and p16INK4 α senescence protein down-regulation in patients treated with belatacept compared to cyclosporin A. *Clin Exp Immunol* 2012;167(2):330-7.
119. Furuzawa-Carballeda J, Uribe-Uribe NO, Arreola-Guerra JM, Reyes-Acevedo R, Vilatobá M, López-Toledo A, Mondragón-Salgado G, Chávez-Fernández R, López-Verdugo F, Mondragón-Ramírez G, Alberú J. Tissue talks: immunophenotype of cells infiltrating the graft explains histological findings and the benefits of belatacept at 10 years. *Clin Exp Immunol* 2019;197(2):250-61.
120. Matsutani T, Li Y, Murakami M, Lee HM, Aoki C, Sekiguchi M, Matsui K, Kitano M, Namiki M, Ohmura K, Murakami K, Fujii T, Kuroiwa T, Shimaoka Y, Nakahara H, Maeda K, Irimajiri S, Funachi M, Imura Y, Ikawa T, Nanpei A, Azuma T, Sasaki T, Yokota A, Kawahito Y, Mimori T, Sano H, Nishimoto N. FRI0206 Abatacept (CTLA4-IG) suppresses T cell activation and reduces TH17 cells as well as plasma IL-6 in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;71(Suppl 3):S383.
121. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010;40(7):1830-5.
122. Weisman MH, Durez P, Hallegua D, Aranda R, Becker JC, Nuamah I, Vratsanos G, Zhou Y, Moreland LW. Reduction of inflammatory biomarker response by abatacept in treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33(11):2162-6.
123. Roy A, Mould DR, Wang XF, Tay L, Raymond R, Pfister M. Modeling and simulation of abatacept exposure and interleukin-6 response in support of recommended doses for rheumatoid arthritis. *J Clin Pharmacol* 2007;47(11):1408-20.
124. Kim KW, Chung BH, Kim B-M, Cho M-L, Yang CW. The effect of mammalian target of rapamycin inhibition on T helper type 17 and regulatory T cell differentiation in vitro and in vivo in kidney transplant recipients. *Immunology* 2015;144(1):68-78.
125. Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, Fossiez F, Banchereau J, Lebecque S, Bruijn JA, De Fijter JW, Van Es LA, Daha MR. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(8):1526-34.
126. Loverre A, Tataranni T, Castellano G, Divella C, Battaglia M, Ditunno P, Corcelli M, Mangino M, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G. IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2011;11(6):1248-59.
127. Fabrega E, Lopez-Hoyos M, San Segundo D, Casafont F, Pons-Romero F. Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl* 2009;15(6):629-33.

128. Haouami Y, Dhaouadi T, Sfar I, Bacha M, Gargah T, Bardi R, Abderrahim E, Goucha R, Ben Abdallah T, Gorgi Y. The role of IL-23/IL-17 axis in human kidney allograft rejection. *J Leukoc Biol* 2018;104(6):1229-39.
129. Nova-Lamperti E, Romano M, Christakoudi S, Runglall M, McGregor R, Mobillo P, Kamra Y, Tsui TL, Norris S, John S, Boardman DA, Lechler RI, Lombardi G, Hernandez-Fuentes MP. Reduced TCR signaling contributes to impaired Th17 responses in tolerant kidney transplant recipients. *Transplantation* 2018;102(1):10-7.
130. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol* 2010;7(3):164-74.
131. Revu S, Wu J, Henkel M, Rittenhouse N, Menk A, Delgoffe GM, Poholek AC, McGeachy MJ. IL-23 and IL-1 β drive human Th17 cell differentiation and metabolic reprogramming in absence of CD28 costimulation. *Cell Reports* 2018;22(10):2642-53.
132. Ville S, Poirier N, Blancho G, Vanhove B. Co-stimulatory blockade of the CD28/CD80-86/CTLA-4 balance in transplantation: Impact on memory T cells? *Front Immunol.* (ePub Review) (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00411/full>) Abgerufen 01.01.2021
133. Xu H, Perez SD, Cheeseman J, Mehta AK, Kirk AD. The allo- and viral-specific immunosuppressive effect of belatacept, but not tacrolimus, attenuates with progressive T cell maturation. *Am J Transplant* 2014;14(2):319-32.
134. Latek R, Fleener C, Lamian V, Kulbokas E, 3rd, Davis PM, Suchard SJ, Curran M, Vincenti F, Townsend R. Assessment of belatacept-mediated costimulation blockade through evaluation of CD80/86-receptor saturation. *Transplantation* 2009;87(6):926-33.
135. Schroder PM, Fitch ZW, Schmitz R, Choi AY, Kwun J, Knechtle SJ. The past, present, and future of costimulation blockade in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2019;24(4):391-401.
136. Gardner DH, Jeffery LE, Soskic B, Briggs Z, Hou TZ, Raza K, Sansom DM. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ promotes the efficacy of CD28 costimulation blockade by abatacept. *J Immunol* 2015;195(6):2657-65.
137. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6(11):1133-41.
138. Cortvrindt C, Speeckaert R, Moerman A, Delanghe JR, Speeckaert MM. The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology* 2017;49(3):247-58.

139. Chung BH, Kim KW, Kim BM, Doh KC, Cho ML, Yang CW. Increase of Th17 cell phenotype in kidney transplant recipients with chronic allograft dysfunction. *PLoS One*. (ePub Research) (<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0145258>) Abgerufen 01.01.2021
140. Griffin GK, Newton G, Tarrío ML, Bu D-x, Maganto-García E, Azcutia V, Alcaide P, Gräbe N, Luscinskas FW, Croce KJ, Lichtman AH. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol* 2012;188(12):6287-99.
141. González-Orozco M, Barbosa-Cobos RE, Santana-Sánchez P, Becerril-Mendoza L, Limón-Camacho L, Juárez-Estrada AI, Lugo-Zamudio GE, Moreno-Rodríguez J, Ortiz-Navarrete V. Endogenous stimulation is responsible for the high frequency of IL-17A-producing neutrophils in patients with rheumatoid arthritis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2019;15(44):1-11.
142. Ren W, Yin J, Duan J, Liu G, Tan B, Yang G, Wu G, Bazer FW, Peng Y, Yin Y. mTORC1 signaling and IL-17 expression: Defining pathways and possible therapeutic targets. *Eur J Immunol* 2016;46(2):291-9.
143. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JP. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 2008;14(1):88-92.
144. Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172(5):2778-84.
145. Álvarez-Quiroga C, Abud-Mendoza C, Doníz-Padilla L, Juárez-Reyes A, Monsiváis-Urenda A, Baranda L, González-Amaro R. CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 2011;31(4):588-95.
146. Pieper J, Herrath J, Raghavan S, Muhammad K, Vollenhoven Rv, Malmström V. CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody-positive rheumatoid arthritis patients. *BMC Immunol* 2013;14(1):34.
147. Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, Laszik ZG, Putnam A, Belingheri M, Gross DM, Townsend RM, Vincenti F. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant* 2008;8(10):2086-96.
148. Glatigny S, Höllbacher B, Motley SJ, Tan C, Hundhausen C, Buckner JH, Smilek D, Khoury SJ, Ding L, Qin T, Pardo J, Nepom GT, Turka LA, Harris KM, Campbell DJ, Bettelli E. Abatacept targets T follicular helper and regulatory T cells, disrupting molecular pathways that regulate their proliferation and maintenance. *J Immunol* 2019;202(5):1373-82.
149. Vogel I, Verbinnen B, Maes W, Boon L, Van Gool SW, Ceuppens JL. Foxp3⁺ regulatory T cells are activated in spite of B7-CD28 and CD40-CD40L blockade. *Eur J Immunol* 2013;43(4):1013-23.

150. Bestard O, Cassis L, Cruzado JM, Torras J, Franquesa M, Gil-Vernet S, Lucia M, Grinyó JM. Costimulatory blockade with mTor inhibition abrogates effector T-cell responses allowing regulatory T-cell survival in renal transplantation. *Transpl Int* 2011;24(5):451-60.
151. Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS, Tang Q, Guinan EC, Battaglia M, Burlingham WJ, Roberts ISD, Streitz M, Josien R, Böger CA, Scottà C, Markmann JF, Hester JL, Juerchott K, Braudeau C, James B, Contreras-Ruiz L, van der Net JB, Bergler T, Caldara R, Petchey W, Edinger M, Dupas N, Kapinsky M, Mutzbauer I, Otto NM, Öllinger R, Hernandez-Fuentes MP, Issa F, Ahrens N, Meyenberg C, Karitzky S, Kunzendorf U, Knechtle SJ, Grinyó J, Morris PJ, Brent L, Bushell A, Turka LA, Bluestone JA, Lechler RI, Schlitt HJ, Cuturi MC, Schlickeiser S, Friend PJ, Miloud T, Scheffold A, Secchi A, Crisalli K, Kang SM, Hilton R, Banas B, Blanco G, Volk HD, Lombardi G, Wood KJ, Geissler EK. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *Lancet* 2020;395(10237):1627-39.
152. Abadja F, Sarraj B, Ansari MJ. Significance of T helper 17 immunity in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17(1):8-14.
153. Ma L, Zhang H, Hu K, Lv G, Fu Y, Ayana DA, Zhao P, Jiang Y. The imbalance between Tregs, Th17 cells and inflammatory cytokines among renal transplant recipients. *BMC Immunol* 2015;16(1):56.
154. Hanidziar D, Koulmanda M. Inflammation and the balance of Treg and Th17 cells in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15(4):411-5.
155. Chadha R, Heidt S, Jones ND, Wood KJ. Th17: contributors to allograft rejection and a barrier to the induction of transplantation tolerance? *Transplantation* 2011;91(9):939-45.
156. Lee GR. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity. *Int J Mol Sci* 2018;19(3):730.
157. Bueno V, Pestana JO. The role of CD8+ T cells during allograft rejection. *Braz J Med Biol Res* 2002;35(11):1247-58.
158. Siu JHY, Surendrakumar V, Richards JA, Pettigrew GJ. T cell allorecognition pathways in solid organ transplantation. *Front Immunol*. (ePub Review) (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02548/full>) Abgerufen 01.01.2021
159. Yap M, Boeffard F, Clave E, Pallier A, Danger R, Giral M, Dantal J, Foucher Y, Guillot-Gueguen C, Toubert A, Souillou JP, Brouard S, Degauque N. Expansion of highly differentiated cytotoxic terminally differentiated effector memory CD8+ T cells in a subset of clinically stable kidney transplant recipients: a potential marker for late graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2014;25(8):1856-68.

160. Jacquemont L, Tilly G, Yap M, Doan-Ngoc TM, Danger R, Guérif P, Delbos F, Martinet B, Giral M, Foucher Y, Brouard S, Degauque N. Terminally differentiated effector memory CD8(+) T cells identify kidney transplant recipients at high risk of graft failure. *J Am Soc Nephrol* 2020;31(4):876-91.
161. Mathews DV, Wakwe WC, Kim SC, Lowe MC, Breeden C, Roberts ME, Farris AB, Strobert EA, Jenkins JB, Larsen CP, Ford ML, Townsend R, Adams AB. Belatacept-resistant rejection is associated with CD28(+) memory CD8 T cells. *Am J Transplant* 2017;17(9):2285-99.
162. van der Zwan M, Hesselink DA, Clahsen-van Groningen MC, Baan CC. Targeted proteomic analysis detects acute T cell-mediated kidney allograft rejection in belatacept-treated patients. *Ther Drug Monit* 2019;41(2):243-8.
163. Mathews DV, Dong Y, Higginbotham LB, Kim SC, Breeden CP, Stobert EA, Jenkins J, Tso JY, Larsen CP, Adams AB. CD122 signaling in CD8+ memory T cells drives costimulation-independent rejection. *J Clin Invest* 2018;128(10):4557-72.
164. Rostaing L, Massari P, Garcia VD, Mancilla-Urrea E, Nainan G, del Carmen Rial M, Steinberg S, Vincenti F, Shi R, Di Russo G, Thomas D, Grinyó J. Switching from calcineurin inhibitor-based regimens to a belatacept-based regimen in renal transplant recipients: a randomized phase II study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6(2):430-9.
165. Shuai L, Cheng Q, Shen T, Yi Z, Wu X. CTLA4-Ig abatacept ameliorates proteinuria by regulating circulating Treg/IL-17 in adriamycin-induced nephropathy rats. *Biomed Res Int. BioMed Research International. (ePub Research)* (<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/2347827/>) Abgerufen 01.01.2021
166. Schulte K, Vollmer C, Klasen V, Bräsen JH, Püchel J, Borzikowsky C, Kunzendorf U, Feldkamp T. Late conversion from tacrolimus to a belatacept-based immunosuppression regime in kidney transplant recipients improves renal function, acid-base derangement and mineral-bone metabolism. *J Nephrol* 2017;30(4):607-15.
167. Holdaas H, Rostaing L, Serón D, Cole E, Chapman J, Fellstrøm B, Strom EH, Jardine A, Midtvedt K, Machein U, Ulbricht B, Karpov A, O'Connell PJ, on Behalf of the AI. Conversion of long-term kidney transplant recipients from calcineurin inhibitor therapy to everolimus: A randomized, multicenter, 24-month study. *Transplantation* 2011;92(4):410-8.
168. Brakemeier S, Kannenkeril D, Dürr M, Braun T, Bachmann F, Schmidt D, Wiesener M, Budde K. Experience with belatacept rescue therapy in kidney transplant recipients. *Transpl Int* 2016;29(11):1184-95.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julie Künzel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Prospektive Untersuchung der T-Zellpopulationen von nierentransplantierten Patienten bei später Umstellung auf Belatacept; A prospective analysis of T-cell populations in kidney transplant patients following late conversion to belatacept" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Angefangen bei Dr. Michael Dürr, der mir das Thema anvertraute und mich langjährig betreute. Den Mitarbeitern des nephrologischen Forschungslabors Katharina Fabritius, Marco Mai sowie Christine Lorkowski, die mir stets mit Rat und Tat bei der Datenerhebung und Auswertung zur Seite standen. Für die stetige Motivation danke ich meinem Großvater Prof. Walter Künzel. Außerdem möchte ich mich bei meinem Onkel Prof. Christoph Loddenkemper für die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit bedanken und bei meinem Freund Tony Jankowski für seine unermüdlichen Mithilfe in Grafik und Design.

Mein besonderer Dank gilt PD. Dr. med. Johannes Waiser, meinem Doktorvater, für sein außerordentliches Engagement und die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit.

Abschließend gilt ein großer Dank meinen Eltern, Dr. Alexander Künzel und Dr. Petra Künzel-Mirel, für die stetige Unterstützung und Geduld während der Zeit meines Studiums und der Fertigstellung meiner Dissertation.