

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Nephrologie  
und internistische Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung des Zytokinprofils und der Biomarker an nierentransplantierten Patienten nach  
Umstellung auf Belatacept

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

von  
Laili Anwari  
aus Kabul

Datum der Promotion: 26.06.2022



## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>III</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>IV</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>VI</b>
<b>V</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Nierentransplantation .....	1
1.1.1	Daten zur Nierentransplantation .....	1
1.2	Rolle des Immunsystems .....	2
1.2.1	Transplantationsimmunologie .....	2
1.2.2	Pathologische Prozesse nach Nierentransplantation .....	2
1.2.3	Die Ko-Stimulation .....	3
1.2.4	Differenzierung aktivierter T-Zellen .....	4
1.2.5	Definition von Zytokinen .....	4
1.2.6	Einteilung der Zytokine .....	5
1.2.7	Zytokine aus dem Multiplex-Versuch und ihre Rolle bei der Immunantwort .....	6
1.3	Immunsuppression .....	9
1.3.1	Corticosteroide .....	9
1.3.2	Zytotoxische Wirkstoffe .....	10
1.3.3	Calcineurininhibitoren .....	10
1.3.4	mTOR-Inhibitoren .....	11
1.3.5	Belatacept .....	12
1.4	Biomarker und klinische Parameter der Nierenschädigung .....	13
1.4.1	Biomarker Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin und Calprotectin .....	13
1.4.2	Klinische Parameter .....	16
1.5	Fragestellung .....	17
<b>2</b>	<b>Methoden und Material</b> .....	<b>18</b>
2.1	Ablauf der Studie .....	18
2.1.1	Probandenkollektiv und Kontrollgruppe .....	18
2.2	ELISA .....	22
2.2.1	Sandwich-ELISA .....	22
2.2.2	NGAL .....	23
2.2.3	Calprotectin .....	24
2.3	Multiplex .....	24
2.3.1	Multiplex-Verfahren .....	25
2.4	Datenverwaltung und statistische Analysen .....	26
2.5	Übersicht über die verwendeten Materialien .....	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
3.1	Charakterisierung der Studienteilnehmer .....	29
3.1.1	Auswirkung der Immunsuppression auf die Biomarker NGAL und Calprotectin .....	32
3.1.2	Effekte auf die weiteren klinischen Parameter der Nierenfunktion: GFR, Proteinurie .....	35
3.1.3	Auswirkung der Immunsuppression auf die Sekretion der Zytokine .....	39
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>49</b>
4.1	Charakterisierung der Immunantwort anhand der Zytokine nach Konversion auf Belatacept im Vergleich zur konventionellen Immunsuppression .....	49
4.2	Beurteilung der konventionellen Immunsuppression im Vergleich zu Belatacept in Hinblick auf die Biomarker NGAL- und Calprotectin und die Nierenfunktion .....	52
4.3	Limitationen der Studie .....	55

4.4	Ausblick .....	56
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
<b>VI</b>	<b>Eidesstaatliche Erklärung.....</b>	<b>XI</b>
<b>VII</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>XII</b>
<b>VIII</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>XIII</b>

# I Abkürzungsverzeichnis

AKI	acute kidney injury
AKIN	Acute-Kidney-Injury-Network
APC	Antigen-präsentierenden Zellen
AUC	Area Under Curve
AR	akute Rejektion
Bel	Belatacept
BENEFIT	Belatacept Evaluation of Nephroprotection and Efficacy as First-Line Immunosuppression Trial
BENEFIT-EXT	BENEFIT-Extended Criteria Donors
BL	Baseline-Zeitpunkt
CAD	chronische Allograftdysfunktion
sCalprotectin	Caprotectin im Serum
CKD-EPI	Chronic-Kidney-Disease-Epidemiology-Collaboration-Formel
CNI	Calcineurininhibitor
CS	Corticosteroide
CTACK	Cutaneous T-Cell Attracting Chemokine
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen-4
CyA	Cyclosporin A
DAMP	damage-associated molecular pattern
DGF	delayed graft function/verzögerte Transplantatfunktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicine Agency
ENA-78	Epithelial neutrophil-activating protein 78
FDA	Federal Drug Administration
FKBP12	FK506-binding protein 12
GFR	glomerulären Filtrationsrate
eGFR	estimated/geschätzte GFR
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HRP	horseradish peroxidase
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
IQA	Interquartilbereich
LIF	Leukemia inhibitory factor
kDa	Kilodalton
M3	Monat 3
M6	Monat 6
M9	Monat 9
MCP-2	Monocyte chiotactic protein-2
MHC	major histocompatibility complex
MIP-1 $\gamma$	macrophage inflammatory protein 1 $\gamma$
MMF	Mycophenolat-Motefil
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRP8/14	myeloid related protein
mTOR	mammalian-Target-of-Rapamycin
mTORi	mTOR-Inhibitor
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NGAL	Neutrophilen-Gelatinase-assoziertes Lipocalin
NK	natürliche Killerzellen
n.s.	nicht signifikant
NTx	Nierentransplantation
PDK1	phosphoinositolabhängigen Kinase 1
PE	Phycoerythrin
PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase

PIP <sub>3</sub> .....	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PLC-γ.....	Phospholipase Cγ
pNGAL.....	NGAL im Plasma
PRR.....	pattern recognition receptor
pts.....	patients
RAGE.....	Rezeptor für „Advanced glycation end-products“
RIFLE.....	Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function, End-stage kidney diseas
RT.....	Raumtemperatur
SA-PE.....	Streptavidin gekoppeltes PE
SCF.....	Stem cell factor
SDF-1a +b.....	Stromal Cell-Derived Factor 1a +b
Tac.....	Tacrolimus
Tfh.....	follikuläre T-Zellen
Th1.....	Typ1-T-Helferzellen
Th2.....	Typ2-T-Helferzellen
TLR4.....	Toll- like receptor 4
TMB.....	Tetramethylbenzidin
TNF.....	Tumornekrosefaktor
TOR.....	Target-of-Rapamycin
TPO.....	Thrombopoetin
TRAIL.....	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tregs.....	regulatorische T-Zellen
TSLP.....	Thymic stromal lymphopoietin

## II Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Reduktionschema von CNI	20
Tab. 2	Reduktionschema von mTORi	20
Tab. 3	Ein- und Ausschlusskriterien für die Konversionsgruppen	21
Tab. 4	Ein- und Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppen	22
Tab. 5	Übersicht über die verwendeten Materialien	27
Tab. 6	Verbrauchsmaterialien	28
Tab. 7	Chemikalien und Medien	28
Tab. 8	Grunderkrankungen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses	30
Tab. 9.	Zusatzmedikation zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses	30
Tab. 10	Charakteristika der Patienten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses	31
Tab. 11	pNGAL Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 im Vergleich zu deren Kontrollgruppen K1 und K2	33
Tab. 12	Verlauf der pNGAL-Konzentration innerhalb der Konversionsgruppe B1 und B2	33
Tab. 13	sCalp Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 im Vergleich zu deren Kontrollgruppen K1 und K2	34
Tab. 14	Verlauf der sCalprotectin Konzentration innerhalb der Konversionsgruppe B1 und B2	35
Tab. 15	GFR der Konversionsgruppen B1 und B2 und deren Kontrollgruppen K1 und K2	36
Tab. 16	GFR der Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf	37
Tab. 17	Albumin-Kreatinin Quotient der Konversionsgruppen B1 und B2 und der Kontrollgruppen K1 und K2 im Verlauf	38
Tab. 18	Albumin-Kreatinin Quotient von Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf	39
Tab. 19	CCL1 Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und deren Kontrollgruppen K1 und K2	40
Tab. 20	CCL1 Konzentration von Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf	41

Tab. 21	CCL8 Konzentration in Konversionsgruppen B1 und B2 und deren Kontrollgruppen K1 und K2	42
Tab. 22	CCL8 Konzentration von Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf	43
Tab. 23	CCL15 Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und deren Kontrollgruppen K1 und K2 im Verlauf	44
Tab. 24	CCL15 Konzentration von Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf	45
Tab. 25	CXCL12 Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und deren Kontrollgruppen K1 und K2 im Verlauf	46
Tab. 26	CXCL12 Konzentration von Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf	46
Tab. 27	Konzentrationen der weiteren 19 Zytokine aus dem Multiplex-Versuch in der Konversionsgruppe B1	47
Tab. 28	Konzentrationen der weiteren 19 Zytokine aus dem Multiplex-Versuch in der Konversionsgruppe B2	48

### **III      Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.	Übersicht zur Einteilung der Chemokine in die Untergruppen	6
Abb. 2	Therapieregime der Studienteilnehmer	19
Abb. 3	Schematische Darstellung der Multiplex-Analyse	26
Abb. 4	NGAL Plasma Konzentration	32
Abb. 5	Calprotectin Konzentration im Serum	34
Abb. 6	Mittelwerte der GFR der Konversionsgruppen B1 und B2 und der Kontrollgruppen K1 und K2	36
Abb. 7	Mittelwerte des Albumin-Kreatinin Quotienten der Konversionsgruppen B1 und B2 und der Kontrollgruppen K1 und K2	38
Abb. 8	CCL1 Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und der Kontrollgruppen K1 und K2	40
Abb. 9	CCL8 Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und der Kontrollgruppen K1 und K2	42
Abb. 10	CCL15 Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und der Kontrollgruppen K1 und K2	44
Abb. 11	CXCL12 Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und der Kontrollgruppen K1 und K2	46

## IV Zusammenfassung

**Einleitung:** Ziel der Studie war die Bestimmung von Chemokinen nach Konversion auf Belatacept gegenüber der konventionellen Standardimmunsuppression mit Calcineurininhibitoren (CNI) oder mammalian-Target-Of-Rapamycin-Inhibitoren (mTORi) nach einer Nierentransplantation (NTx) sowie die Bewertung der Biomarker Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) und Calprotectin als prognostische Prädiktoren der Nierenschädigung.

**Methodik:** Die Konversion des CNI- und mTORi-basierten Therapieregimes auf Belatacept (n = 18) wurde der konventionellen Therapie mit CNI und mTORi (n = 18) gegenübergestellt. Es erfolgte ein Matching der auf Belatacept konvertierten Patienten zu deren Kontrollpatienten hinsichtlich des Alters, Geschlechts und der Nierenfunktion. Serum- und Plasmaproben wurden zum Baseline-Zeitpunkt (BL), Monat drei (M3), Monat sechs (M6) und Monat neun (M9) aliquotiert. 23 Chemokinen wurden mittels Multiplex Technik genauer betrachtet. Zwei Biomarker, NGAL und Calprotectin wurden zum BL und nach M3 mit einem enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) gemessen (ng/ml).

**Ergebnisse:** Nach Konversion von CNI auf Belatacept zeigte die Konversionsgruppe eine stärkere Expression von CCL1 (BL: 5,9 vs. M6: 8,8; p = 0,01) und CCL8 (BL: 41,9 vs. M6: 56, p = 0,01). Die Sekretion des CLL8 nahm in den von mTORi auf Bel konvertierten Patienten zu (BL: 33,1 vs. M9: 42,5; p = 0,02). Auch war ein Anstieg des CCL15 sowohl in der von CNI auf Bel konvertierten Gruppe (BL: 5.377,7 vs. M9: 10.901; p = 0,01) als auch in den von mTORi konvertierten Patienten (BL: 8.572,5 vs. M3: 9.985,6; p = 0,01) zu verzeichnen. Die CXCL12 Expression nahm nach Konversion auf Belatacept von mTORi (BL: 2.791,7 vs. M3: 3.397,1; p = 0,02) sowie von CNI zu (BL: 3.250,5 vs. M9: 4.072,6; p = 0,03). NGAL zeigte einen Anstieg in der Konversionsgruppe von mTORi auf Belatacept (BL: 166,3 vs. M3: 270,3; p = 0,03). Währenddessen hatten die unterschiedlichen Therapieregime keinen Effekt auf Calprotectin nach Konversion.

**Schlussfolgerung:** Die Konversion auf Belatacept führte zur Zunahme einzelner Chemokine und des NGAL in den von mTORi auf Belatacept konvertierten Patienten. Dies könnte möglicherweise auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen des CNI, mTORi und Belatacept zur Hemmung der T-Zellaktivierung und -proliferation zurückzuführen sein. Dennoch stellt das Belatacept gegenüber der Standardimmunsuppression mit CNI und mTORi mit ihren ungünstigen Nebenwir-

kungsprofilen eine weitere Therapiemöglichkeit in NTx-Patienten zur Abstoßungsprophylaxe dar. Das Calprotectin eignete sich aufgrund seiner geringen Spezifität nicht als prädiktiver Marker der Nierenschädigung. Der Einsatz von NGAL als Surrogatparameter sollte weiter erforscht werden sowie weitere Biomarker zur Diagnostik der Nierenschädigung im Rahmen von weiteren Umstellungsstudien.

## V Abstract

**Introduction:** Limiting data exist concerning chemokine profile and new biomarkers of patients (pts) under belatacept (BEL) based therapy after renal transplantation (tx).

The evaluation of certain chemokines and biomarkers may offer an opportunity to explore the effect and the impact of different immunosuppressive regimen.

**Methods:** N = 18 pts were converted from a calcineurin inhibitor (CNI) or inhibitor of mammalian target of rapamycin (mTORi) to a BEL-based regimen compared to control pts (n = 18) with continued CNI or mTORi therapy (matched for age, sex, and renal function). Serum and Plasma samples were collected for baseline (BL) and at month 3, 6, 9 (M3, M6, M9). 23 analytes analyzed by the Luminex-based multiplex technique. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and Calprotectin concentration were measured at BL and Mo3 by ELISA.

**Results:** After conversion to Bel pts that were converted from CNI express higher levels of CCL1 (BL: 5,9 vs. M6: 8,8;  $p = 0,005$ ) and CCL8 (BL: 41,9 vs. M6: 56,  $p = 0,005$ ). Secretion of CLL8 rises in Bel pts after conversion from mTORi (BL: 33,1 vs. M9: 42,5;  $p = 0,021$ ). Pretreatment with CNI lead to a later increase of CCL15 (BL: 5377,7 vs. M9: 10901;  $p = 0,005$ ) than with mTORi (BL: 8572,5 vs. M3: 9985,6;  $p = 0,011$ ). CXCL12 expression increases under BEL treatment in mTORi converted pts (BL: 2791,7 vs. M3: 3397,1;  $p = 0,021$ ) and in CNI converted pts between BL and Mo9 (BL: 3250,5 vs. M9: 4072,6;  $p = 0,037$ ). Biomarker NGAL showed an increased level in pts converted from mTORi to Bel (BL: 166,3 vs. M3: 270,3;  $p = 0,038$ ). The therapy regimen had no effect on Calprotectin after conversion.

**Conclusion:** Conversion to Belatacept led to an increase of several chemokines and NGAL in the patients who were converted from mTORi. This could be due to the different mechanisms of action of the CNI, mTORi and Belatacept to inhibit T-cell activation and proliferation. However, compared to the standard immunosuppression with CNI and mTORi, with its side effect profiles, belatacept represents an alternative treatment option for rejection prophylaxis in NTx patients. Due to its low specificity, calprotectin is not suitable as a predictive marker of kidney damage and the potential of NGAL still needs approval. Research into biomarkers for diagnosing kidney damage is necessary as part of further conversion studies.

# 1 Einleitung

## 1.1 Nierentransplantation

### 1.1.1 Daten zur Nierentransplantation

Ein historischer Rückblick zeigt, dass bereits 1954 eine Nierentransplantation zwischen monozygotischen Zwillingen durch Joseph E. Murray in Boston erfolgreich durchgeführt wurde<sup>1</sup>. Bei den Organtransplantationen zählte die Niere 2020 mit 1909 Transplantationen zu den am häufigsten transplantierten Organen. Im selben Jahr standen 7600 Patienten auf der Warteliste zur Nierentransplantation (NTx)<sup>2</sup>. Bei einer terminalen Niereninsuffizienz stellt die Hämodialyse/Peritonealdialyse oder die Nierentransplantation die Behandlungsmethode der Wahl dar. Die NTx gehört heute zu den routinemäßigen Eingriffen und verbessert die Lebensqualität und Überlebenschancen sowie die Behandlungskosten betroffener Patienten gegenüber der Dialyse deutlich. Während die 1-Jahres-Nierentransplantatüberlebensrate der postmortalen Spende 92 % beträgt (2006–2015), liegt die 5-Jahres-Nierentransplantatüberlebensrate bei 84,8 %<sup>3</sup>. Die 1-Jahresüberlebensrate ist von der Frequenz akuter Rejektionen abhängig, während der Langzeit-Outcome der NTx durch chronische Rejektionen und die medikamenten-induzierte Nephrotoxizität multifaktoriell beeinflusst wird<sup>4 5</sup>. Die Immunsuppression nimmt in der Posttransplantationsphase einen entscheidenden Stellenwert für den Transplantat-Outcome ein<sup>3</sup>. Da die konventionellen Immunsuppressiva, die Calcineurininhibitoren (CNI) und mammalian-Target-Of-Rapamycin-Inhibitoren (mTORi) mit zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sind, stellt das Belatacept als neues Immunsuppressivum mit einer potenten Prävention von Rejektionen und geringer Toxizität eine vielversprechende Alternative dar. Um ein Monitoring der immunsuppressiven Therapie unter den Standardimmunsuppression von CNI oder mTORi gegenüber dem Belatacept zu ermöglichen, können einerseits Zytokine als Marker für immunologische Aktivitäten in der Transplantatniere herangezogen werden. Andererseits können auch Marker der Nierenschädigung für die präventive Diagnostik einer Transplantat-Schädigung verwendet werden.

## **1.2 Rolle des Immunsystems**

### **1.2.1 Transplantationsimmunologie**

Die Hauptfunktion des Immunsystems besteht darin, Krankheitserreger und Fremdartige abzuwehren. Diese Abwehrreaktionen des Körpers werden als Immunreaktionen bezeichnet, die sich auf das angeborene oder adaptive Immunsystem beziehen können. Das Immunsystem des Empfängers kann nach einer Transplantation Fremdartige erkennen und direkt oder indirekt mit einer alloreaktiven Immunantwort gegen das empfangene Transplantat reagieren. Bei der Transplantation von Organen ist die adaptive Immunantwort entscheidend an einer Abstoßung des Fremdorgans beteiligt. Erfolgt die Transplantation zwischen Individuen der gleichen Spezies, wird von einer allogenen Transplantation gesprochen. Die Alloreaktivität des Empfängers ist von der Kompatibilität mit den major-histocompatibility-complex(MHC)-Genen des Spenderorgans abhängig. Bei fehlender oder geringer Übereinstimmung der MHC-Gene steigt die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion, die zellulär oder humoral abläuft.

### **1.2.2 Pathologische Prozesse nach Nierentransplantation**

Das Immunsystem samt alloreaktiver Immunzellen, darunter T- und B-Zellen, Makrophagen und Mediatoren der Immunantwort, wie Chemokinen, Zytokinen und Integrinen, spielen eine Schlüsselrolle für die Entwicklung der Immunakzeptanz gegenüber dem NTx oder der Rejektion des Transplantats<sup>6 7</sup>. Die derzeitigen Therapiemöglichkeiten verhindern keine chronische Allograftdysfunktion (CAD), die ein Syndrom darstellt und die häufigste Ursache für den Transplantatverlust im Langzeitverlauf ist. Anhand des histopathologischen Erscheinungsbildes der Nierenschädigung lassen sich die NTx-Veränderungen nach der international anerkannten BANFF-Klassifikation einteilen<sup>8</sup>. Sie umschließt verschiedene Rejektionsformen, die humorale und die zelluläre sowie histologische Veränderungen mit nicht-klassifizierbarer Ursache. Das Auftreten der chronischen Allograftdysfunktion ist hingegen multifaktoriell. Es kann durch Proteinurie, Hypertonie, immunologische und nicht-immunologische Faktoren, das Spenderalter, das Auftreten akuter Rejektionen, HLA-Antikörper, virale Infektionen, Hyperlipidämie und CNI-Toxizität verursacht werden. Neben der Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Einordnung des Biopsie-Ergebnisses in der BANFF-Klassifikation sollten weitere prädiktive Diagnosekriterien herangezogen werden<sup>8</sup>. Zytokine und Biomarker stellen vielversprechende Möglichkeiten zur verbesserten Risikoabschätzung von chronischen Allograftdysfunktionen dar.

### 1.2.3 Die Ko-Stimulation

Im Rahmen der adaptiven Immunität ist ein zweites Signal, das costimulierende Signal durch die Bindung an den costimulierenden Rezeptor, für die Aktivierung naiver B- und T-Zellen neben der Bindung des B- und T-Zellrezeptor durch ein Antigen erforderlich. Zu den costimulierenden Rezeptoren gehören die CD28-Protein-Familie und die TNF-Superfamilie. Für die Ko-Stimulation naiver T-Zellen ist der CD28-Rezeptor zuständig. Der zugehörige costimulierende Ligand befindet sich auf antigenpräsentierenden Zellen. Die Signalübertragung beginnt mit dem Auftreffen der naiven T-Zelle auf ihr spezifisches Antigen. Neben der Bindung des T-Zellen-Rezeptor-Antigen-Komplexes muss die T-Zelle zur Ko-Stimulation mit ihrem CD28-Rezeptor den entsprechenden Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf den dendritischen Zellen binden. Dadurch können die T-Zellen proliferieren, während sowohl die Zytokinproduktion als auch das Fortbestehen der T-Zelle zunimmt. Im Zytoplasma führt dies zur Phosphorylierung von CD28 und aktiviert somit die Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3-Kinase), die mit der Produktion von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) beginnt. PIP<sub>3</sub> sorgt für die weitere Phosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase AKT durch PDK1 (phosphoinositolabhängige Kinase 1), wodurch der Metabolismus angeregt und die Lebensdauer erhöht wird. Ebenfalls leitet PIP<sub>3</sub> die Kinase Itk zur Membran, die durch Phosphorylierung von Phospholipase C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) aktiviert wird. Des Weiteren ist PIP<sub>3</sub> für die Rekrutierung von Vav verantwortlich, was zur Aktivierung von Cdc42 führt und die Actinpolymerisierung bewirkt. Die zentrale Aufgabe besteht in der Bindung von CD28 an das B7-Molekül, das die PI-3-Kinase aktiviert, die anschließend PIP<sub>3</sub> produziert. Durch die CD28-Ko-Stimulation werden Reaktionen verstärkt, die nach der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors entstehen. Das PLC- $\gamma$  ist für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren für das IL-2-Gen zuständig. Es wird durch Signale des T-Zell-Rezeptors mit gebundenem CD28 aktiviert. Während der aktive T-Zell-Rezeptor die Bildung von NFAT und AP-1 verstärkt, bewirkt CD28 die Bildung des NF- $\kappa$ B. Diese Signale führen zur vermehrten IL-2-Bildung. Dieses wirkt entscheidend bei der Stimulation der T-Zell-Proliferation sowie der Differenzierung zu Effektorzellen mit.

Für die Aktivierung naiver T-Zellen sind drei Signale erforderlich:

1. Bindung des T-Zell-Rezeptors an das spezifische Antigen, den Peptid-MHC-Komplex
2. Ko-Stimulation zur Vermehrung und zum Überleben naiver Zellen
3. Zytokine zur Differenzierung der Untergruppen von Effektorzellen

### **1.2.4 Differenzierung aktivierter T-Zellen**

Die Antigenpräsentation der dendritischen Zellen führt zur Aktivierung naiver T-Zellen. APCs, u. a. Makrophagen oder B-Zellen, können in aktivierten antigenspezifischen T-Zellen Effektorfunktionen induzieren. Dies stellt den Beginn der adaptiven Immunantwort dar. Hierbei übernehmen Zytokine eine entscheidende Rolle und geben vor, zu welchen T-Effektorzellen sich die naive T-Zelle differenziert. Auch T-Effektorzellen können bestimmte Zytokine freisetzen und dadurch andere Immunzelltypen in ihrer Funktion verstärken. Die aktivierten naiven T-Zellen können sich zu zwei Hauptgruppen differenzieren, den T-Zellen mit dem CD8-Corezeptor und dem CD4-Corezeptor, und haben demnach unterschiedliche Funktionen. CD8-T-Zellen können als zytotoxische CD8-T-Zellen den MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex erkennen und virusinfizierte Zellen abtöten. Die CD4-T-Zellen können sich in fünf Subpopulationen differenzieren, darunter die Th1-, Th2-, Th17-, Tfh- (follikuläre) und die regulatorischen T-Zellen (Tregs). Sie werden anhand ihres unterschiedlichen Zytokinprofils definiert. Jedes Zytokin kann bei verschiedenen Zelltypen mehrere Aktivitäten auslösen. Wie Zytokine in vivo genau wirken, bleibt ungeklärt. Abhängig von der Zytokin-Konzentration und Stabilität des Zytokins wirkt es entweder auf sein direktes Umfeld oder auf entfernte Zielzellen<sup>9</sup>.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es, die Zytokinprofile unter den unterschiedlichen Immunsuppressiva zu ermitteln. In einigen Studien wurde die Rolle der T-Effektorzellen Th1- und Th2-Zellen in nierentransplantierten Patienten verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass Zytokine der Th2-Zellen eine bedeutende Rolle in der Transplantationsimmunologie spielen.

### **1.2.5 Definition von Zytokinen**

Zellen können Proteine, sogenannte Zytokine sezernieren, die, u. a. vor allem als Mediatoren mit Wirkung auf Immunzellen, die Immunantwort direkt beeinflussen oder intensivieren. Dabei fungieren Zytokine als Entzündungsmediatoren und wirken ähnlich wie Hormone. Sensorzellen, wie Makrophagen oder neutrophile Granulozyten mit aktivierten Rezeptoren, können durch das entsprechende Zytokin entweder weitere Zytokine freisetzen oder Fremdartigene zerstören. Es werden zwei Gruppen von Mediatoren unterschieden, Zytokine und Chemokine. Während einer Entzündung kommt es zu verstärktem Lymphfluss, indem Antigene der Krankheitserreger oder mit Antigenen beladene Immunzellen zum lymphatischen Gewebe transportiert werden. Die Vermittlung zwischen den Zellen des Immunsystems in der Blutbahn und den lymphatischen Organen erfolgt über Zytokine aus dem Endothel. Über Chemokine werden die Immunzellen zum Ort der Infektion gelockt und anschließend über die Lymphbahnen zu den sekundären lymphatischen

Organen geleitet. Hier kann mit der Aktivierung von Effektorzellen eine adaptive Immunreaktion entstehen<sup>9</sup>.

### **1.2.6 Einteilung der Zytokine**

Alle aus Zellen sezernierte Proteine werden als Zytokine bezeichnet, von denen mittlerweile über 60 verschiedene bekannt sind. Sie binden an ihren zugehörigen Zytokin-Rezeptor, der spezifisch auf den Zielzellen sitzt. Somit hängt das Wirkungsspektrum der Zytokine von der Expression des jeweiligen Rezeptors auf den Immunzellen ab.

Mit einer Größe von 25 kDa wirken diese sezernierten Proteine autokrin, parakrin oder endokrin. Sie lassen sich anhand ihrer Struktur in vier Familien einteilen: IL-1-Familie, Hämatoetin-Superfamilie, Interferone- und TNF-Familie. Jeder dieser Zytokin-Familien besitzt eine zugehörige Rezeptor-Familie.

Die Chemokine bilden eine spezialisierte Untergruppe der Zytokine. Ihre Hauptfunktion besteht in der Anlockung von Immunzellen mit spezifischen Chemokinrezeptoren zum Entzündungsort und der Organisation der Immunzellen innerhalb der verschiedenen Zonen des lymphatischen Gewebes. Sie binden an die Chemokinrezeptor-Familie, die als siebenteilige Transmembranproteine vorkommen. Die Signale werden über G-Proteine vermittelt. Sie wirken chemotaktisch aktiv auf reaktive Zellen am Entzündungsort und bewirken die Bewegung, die Chemotaxis, dieser Zellen zu den Chemokinen. Letztere werden nicht nur von Immunzellen, sondern auch von anderen Zelltypen produziert und sezerniert. Die Stimulation durch Chemokine führt zu Zelladhäsion und dem Umbau des zellulären Zytoskeletts und bewirkt somit eine Chemotaxis. Sie spielen sowohl bei der angeborenen Immunantwort als auch der adaptiven Immunität eine erhebliche Rolle, beeinflussen die Entwicklung und Wanderung von Lymphozyten sowie die Angiogenese<sup>9</sup>.

Die Chemokine lassen sich in vier Chemokin-Untergruppen unterteilen. Zu den zwei größeren Gruppen gehören die CC-Chemokine und CXC-Chemokine. Während in der erstgenannten die beiden Cysteine nebeneinander am Aminoterminus liegen, sind in CXC-Chemokinen beide Cysteinreste durch Aminosäuren strukturell getrennt. Die zugehörigen Rezeptoren der CC-Chemokine sind CCR1–10. Die CXC-Chemokine binden an die Rezeptoren CXCR1–7. Die Chemokine einer Gruppe können nicht an Rezeptoren aus einer anderen binden. Die Gene der CC-Chemokine sind auf den Chromosomen 4 lokalisiert, während sich die Gene der CXC-Chemokine auf Chromosomen 17 befinden. Die unterschiedlichen Rezeptoren werden von verschiedenen Zellen exprimiert. Zu den etwas kleineren Gruppen gehören die CX3C- und die XC-

Chemokine. Die CX3C-Chemokinfamilie besitzt drei Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen. Im Gegensatz dazu fehlt der XC-Chemokin-Familie das erste und dritte Cystein<sup>10 11</sup>.

Im Folgenden werden die Eigenschaften von drei Chemokinen aus der CC-Chemokin-Familie und einem Mitglied der CXC-Chemokin-Familie aus unseren Multiplex-Versuchen näher beleuchtet.

### Struktur der Chemokine

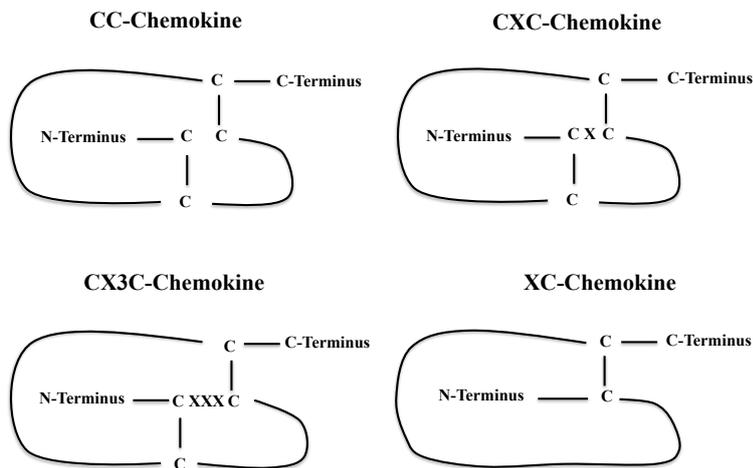


Abbildung 1. Übersicht zur Einteilung der Chemokine in die Untergruppen.

#### 1.2.7 Zytokine aus dem Multiplex-Versuch und ihre Rolle bei der Immunantwort

##### CCL1

Das CCL1 (auch I-309), ein Protein aus der Gruppe der CC-Chemokine, bindet an CCR8. Es reguliert Th1-Zellen, aber auch weitere Chemokine, wie Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). Weiterhin können CCL2, 8, 11, CCL3, CCL4, CCL5 und CXCL10 die Th1-Zellen aktivieren. Die Th1-Zellen reagieren mit einer verzögerten Hypersensibilität und zellulären Abstoßung. Bei Patienten, die kurz vor einer NTx standen, war der Spiegel an CCL1 erhöht, daher wird dem CCL1 eine proinflammatorische Eigenschaft zugeschrieben. Nach NTx nahm der Plasmaspiegel an CCL1 wieder ab. Bei Patienten, die an Arteriosklerose und Niereninsuffizienz im Stadium 5 litten, war das CCL1 ebenfalls erhöht. Nach der Transplantation war eine Verschiebung des Chemokinprofils mit Hochregulation derjenigen Chemokine zu verzeichnen, die an der Th1-Reaktion beteiligt sind<sup>12</sup>.

## **CCL8**

Das CCL8 ist Mitglied der CC-Chemokin-Familie und wird auch MCP-2 (Monocyte chemoattractant protein 2) genannt. Strukturell ist es dem MCP-1 ähnlich. Das MCP-2 bindet an mehrere Rezeptoren, u. a. das CCR1, CCR2, CCR3 und CCR5. Es wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Eosinophile und Basophile. Fibroblasten und Leukozyten werden durch Entzündungsmediatoren, z. B. durch das IFN- $\gamma$ , zur Produktion geringer Mengen des MCP-2 stimuliert. Neben dem IFN- $\gamma$  induziert auch IL-1 $\beta$  MCP-2 in Fibroblasten und glatte Muskelzellen des Bronchialsystems<sup>13</sup>. MCP-2 kann als natürlicher Inhibitor der Entzündungsantwort gesehen werden, da es bei viralen oder bakteriellen Infektionen in hoher Konzentration produziert wird und Monozyten, Lymphozyten, Eosinophile und Basophile anlockt. Die anfänglich synergistische Aktivierung von MCP-2 durch weitere Chemokine der CXC-Chemokin-Familie zur Verstärkung der Immunantwort kehrt im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion in den gegenteiligen Effekt um. Gleichzeitig agiert es als Inhibitor der Entzündungsreaktion, indem es weitere Chemokine hemmt und MCP-2-Rezeptoren bindet, vor allem CCR2. MCP-2 wirkt nach proteolytischer Inaktivierung als Rezeptor-Antagonist und hemmt die Rekrutierung weiterer Leukozyten durch doppelte negative Rückkopplung.

Durch diese Eigenschaft scheint das MCP-2 die Fähigkeit zu verlieren, die Tumorbildung zu hemmen. Bei Patienten mit Transplantation hämatopoetischer Stammzellen und dem Vorliegen einer Graft-versus-Host-disease wurden erhöhte Level an CCL8 im Serum festgestellt. Die allogene Aktivierung von T-Zellen im Spenderorgan beginnt durch Antigen präsentierende Zellen (APC) des Spenders. Reife dendritische Zellen, die professionelle APCs darstellen und CCL8 sezernieren, können nun naive T-Zellen aktivieren. CCL8 wird als Biomarker zur Frühdiagnostik einer GvHD eingesetzt<sup>14</sup>.

## **CCL15**

CCL15, auch unter HCC-2, NCC-3, MIP-5, Lkn-1 und Macrophage-Inflammatory-Protein 1 $\delta$  (MIP-1 $\delta$ ) bekannt, wird den CC-Chemokinen zugeordnet<sup>15</sup>. Die Gene befinden sich auf dem Chromosom 17q11-q21<sup>16</sup>. Strukturell gehört es zur Gruppe der CC-Chemokine, besitzt jedoch zusätzlich zwei Cystein-Reste<sup>16</sup>. Bekannt sind drei Molekülformen des CCL15 mit unterschiedlicher Länge der Aminosäuresequenzen, woraus unterschiedliche biologische und biochemische Wirkungen folgen. Die zugehörigen Rezeptoren des CCL15 sind der CCR1- und der CCR3-Rezeptor<sup>17</sup>. Die Expression des CCL15 erfolgt in der Leber, dem Darm und den Lungenleukozyten<sup>18</sup>. CCL15 ist ein klassisches inflammatorisches Chemokin, das nahezu alle Immunzellen,

u. a. Monozyten, Eosinophile, Makrophagen, dendritische Zellen, Neutrophile und T-Zellen, rekrutieren kann und gleichzeitig modulierend auf Stammzellen und myeloide Zellen wirkt<sup>19</sup>.

Eine entscheidende Funktion übernimmt das CCL15 bei der Angiogenese. Durch Studien an Ratten wurde die Förderung der Zellproliferation am Aortenring in Abwesenheit des aktiven Entzündungsgeschehens bestätigt<sup>17</sup>. Im Plasma von Patienten mit chronischem Nierenversagen ist die Expression des CCL15 erhöht sowie die neutrophilenunabhängige, proteolytische Aktivierung des CCL15<sup>20</sup>.

## **CXCL12**

Das CXCL12 oder Stromal-Cell-Derived-Factor 1a +b (SDF-1a +b), aus der CXC-Chemokin-Subfamilie, bindet an den zugehörigen CXCR4-Rezeptor oder CXCR7, wobei a und b für die unterschiedlichen Isoformen stehen. Das Erythropoetin fördert durch die Zunahme des Chemokins SDF-1 die Aktivierung von Mesenchymzellen des Knochenmarks. Weiterhin bindet das SDF-1 den CXCR4-Rezeptor, der sich auf den mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks befindet. Das SDF-1 ist relevant für die Verankerung und Wanderung von Stammzellen in ihren jeweiligen Speicherorten der lymphatischen Organe. Kommt es zu einer Entzündung der Niere oder des Herzes, steigt die Konzentration des SDF-1, sodass es nun jene Lymphozyten mit dem CXCR4-Rezeptor zum Entzündungsort anlockt und chemotaktisch wirkt, indem es die Zellbeweglichkeit beeinflusst. Die vermehrte Expression von CXCR4 ist für Tumorentwicklung, Proliferation, Überleben, Angiogenese, Homing und Metastasierung von Tumoren erheblich<sup>21</sup>. Auch kleinzellige Lungenkrebszellen coexprimieren c-Kit und CXCR4, in denen durch die Rezeptorbindung das SDF-1 $\alpha$  die Wanderung und Metastasierung reguliert. Die Aktivierung der Rezeptoren führt über die AKT und p70-S6-Kinase zu morphologischen Zellveränderungen, der Bildung von Filopodien und zytoplasmatischen Vorstülpungen mit erhöhter Zellbeweglichkeit<sup>22</sup>. Auch in malignen Nierenzellen wird das CXCR4 stark exprimiert und fördert Wachstum und Metastasierung von Tumoren<sup>23</sup>.

### 1.3 Immunsuppression

Eines der bedeutendsten Ziele der heutigen Transplantationsmedizin ist die effektive Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen bei möglichst geringen Nebenwirkungen, um so die Transplantat-Überlebensrate zu verlängern. Die Akzeptanz des implantierten Gewebes oder Organs gegenüber dem Immunsystem des Empfängers ist das Hauptziel, um die Schädigung des Transplantats und somit die Toxizität durch Medikamente zu vermeiden oder möglichst zu minimieren. Die Immunsuppressiva lassen sich in folgende Gruppen einteilen:

- Corticosteroide,
- Zytotoxika,
- nicht-toxische Wirkstoffe, gewonnen aus Bakterien und Pilzen, darunter CNI und mTORi,
- monoklonale Antikörper und
- Fusionsproteine, u. a. Belatacept.

#### 1.3.1 Corticosteroide

Die Corticosteroide (CS) kommen seit 1950 als Immunsuppressiva bei Autoimmunerkrankungen, Allergien, Atemwegserkrankungen sowie Organtransplantationen zum Einsatz. Zu dem am häufigsten eingesetzten Corticosteroid gehört Prednisolon aus der Glucocorticoid-Familie. Es durchdringt die Zellmembran und bindet intrazelluläre Zellkernrezeptoren. Aktivierte Glucocorticoid-Rezeptoren binden nun im Zellkern die DNA und beeinflussen dadurch Transkriptionsfaktoren. Über diese Bindung wird die Synthese von Zytokinen, Prostaglandinen, Leukotrienen, Stickstoffmonoxid und Adhäsionsmolekülen für Leukozyten aus Blutgefäßen reduziert. Weiterhin fördern sie die Apoptose von Leukozyten und Lymphozyten über eine erhöhte Endonuclease-Aktivität. Hierdurch entfalten sie ihre antiinflammatorische Wirkung und sind ein erheblicher Bestandteil der Therapie von NTx-Patienten zur Prophylaxe von Transplantatabstoßungen sowohl in der Induktions- als auch in der Erhaltungstherapie. CS modulieren ein großes Spektrum von Zellen und daher hat die CS-Therapie komplexe Auswirkungen. Dadurch sind sie mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden, zu denen u. a. Osteoporose, die Beeinträchtigung des Glucose- und Lipidstoffwechsels, kardiovaskuläre, gastrointestinale sowie immunologische Veränderungen und psychologische Störungen gehören. Aufgrund dieser unerwünschten Nebenwirkungen unter CS kommen weitere Immunsuppressiva bei NTx-Patienten zum Einsatz<sup>9 24 25</sup>.

### 1.3.2 Zytotoxische Wirkstoffe

Zu einer weiteren Gruppe von Immunsuppressiva gehören zytotoxische Wirkstoffe, u. a. Mycophenolsäure, Azathioprin und Cyclophosphamid. Nach Nierentransplantationen kommt häufig das Mycophenolat-Mofetil (MMF: z. B. CellCept<sup>®</sup>) als Prodrug zur Anwendung, das in die aktive Form, die Mycophenolsäure, umgesetzt wird. Es folgt die Blockade des Enzyms Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), das an der de-novo-Synthese von Guanosinmonophosphat und Purinen beteiligt ist. Da die DNA-Synthese in Lymphozyten über die de-novo-Synthese läuft, kann durch die Blockade der Purinsynthese keine DNA-Replikation und keine Zellteilung erfolgen. Es kommt folglich zu einer starken anti-proliferativen Wirkung. Bei der Therapie unter MMF ist ein später Transplantatverlust sowie die Toxizität des Azathioprin und Mycophenolat gegenüber dem Cyclophosphamid geringer.

### 1.3.3 Calcineurininhibitoren

Der Calcineurininhibitor Tacrolimus (Prograf<sup>®</sup>) wurde 1984 in der Region Tsukuba (Japan) aus den *Streptomyces tsukubaensis* isoliert<sup>26</sup>. Sowohl das Tacrolimus (Tac) als auch das Cyclosporin A (CyA: Sandimmun<sup>®</sup>) zählt zu den Calcineurininhibitoren. CyA ist als ringförmiges Dekapeptid aufgebaut und wurde erstmals in einem Pilz namens *Tolypocladium inflatum* entdeckt. Tacrolimus gehört zu den Makrolidverbindungen. CNI werden sowohl in der Induktions- als auch in der Erhaltungstherapie eingesetzt. Die Hemmung der T-Zellproliferation durch Tac und CyA erfolgt über die Blockade der Phosphataseaktivität des calciumabhängigen Enzyms Calcineurin. Dieses aktiviert den Transkriptionsfaktor nuclear-factor-of-activated-T-cells (NFAT) und dieser bewirkt wiederum die Expression von Zytokinen, u. a. dem IL-2, die der T-Zell-Aktivierung und dem Wachstum von T-Zellen dienen. Die T-Zellen reagieren entweder auf spezifische Antigene oder körperfremde Zellen. Die Aktivierung des TCR und die Ko-Stimulation über CD28 führen intrazellulär zum Calcium-Einstrom, wodurch die Serin-/Threonin-Phosphatase, Calcineurin, typischerweise über Calmodulin aktiviert wird. Unter CNI (Cyclosporin oder Tacrolimus) wird das Calcineurin jedoch durch Bindung der CNI an Immunophiline, CyA an Cyclophilin und Tac an das FK506-binding-protein 12 (FKBP12), gehemmt. Durch die Hemmung der calciumaktivierten Serin-/Threonin-Phosphatase, Calcineurin, kann das NFAT nicht dephosphoryliert werden und als Transkriptionsfaktor die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen bewirken. An das NFAT binden sich im Allgemeinen weitere Transkriptionsfaktoren, die die Entstehung einer spezifischen T-Zelllinie bedingen. Die Th1-Differenzierung wird über den NFAT1/Tbet-Komplex induziert und bewirkt die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$  and IL-12, während die Produktion der Th2-Zellen durch den NFAT2/GATA3-Komplex gefördert wird und IL-4, IL-5 und

IL-13 sekretiert werden. Es wird vermutet, dass durch die CNI und die Blockierung des NFAT-Wegs eine unspezifische Hemmung der T-Zelllinien erfolgt. Daher wird den Wirkstoffen in der Transplantationsmedizin eine bedeutende Funktion zugesprochen, die in der Vermeidung einer Transplantatrejektion besteht<sup>9 27</sup>. So überzeugt die Transplantatüberlebensrate ein Jahr nach Transplantation unter CNI Therapie mit 90–95 %<sup>28</sup>. Jedoch tritt im Langzeitverlauf häufiger eine akute oder chronische CNI-Nephrotoxizität auf. In der Banff-Klassifikation wird die CNI-Nephrotoxizität mit dem histologischen Bild der thrombotischen Mikroangiopathie, der arteriölen Hyalinose, der interstitiellen Fibrose, der Glomerulosklerose oder tubulären Mikrokalzifikationen beschrieben und resultiert in einer eingeschränkten Transplantatfunktion<sup>29</sup>. Die Nebenwirkungsprofile beider CNI, Tac und CyA, sind vergleichbar, doch unter Tac kommt es häufiger zu Diabetes, Neurotoxizität und gastrointestinalen Störungen, während kardiovaskuläre Nebenwirkungen wie Hypertonie, Dyslipidämie und Hypercholesterinämie eher unter CyA auftreten<sup>30</sup>. Virale Infektionen sind häufige unerwünschte Arzneimittel-Nebenwirkungen beider CNI<sup>32 33</sup>. Letztlich ist das Tac potenter gegenüber dem CyA in der Prophylaxe und Behandlung von Rejektionen und verbessert das Transplantatüberleben<sup>30</sup>.

### 1.3.4 mTOR-Inhibitoren

Erstmalig wurde Rapamycin (Sirolimus) in der Studie von Vézina et al. (1975) erwähnt und aus den *Streptomyces hygroscopicus* gewonnen. Zunächst standen die antifungalen Eigenschaften gegenüber *Candida albicans* im Vordergrund<sup>36</sup>, doch weitere Studien zeigen, dass mammalian-Target-of-Rapamycin (mTOR) weitaus vielschichtiger Aufgaben übernimmt. Dazu zählen etwa die Signaltransduktion für das Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, zelluläre Entzündungen oder Entzündungsprozesse im Gewebe, Autophagie, Angiogenese und der Zellzyklus von G1- zu S-Phase<sup>37 38</sup>. Das Zellwachstum und die Proliferation sowohl immunkompetenter als auch mesenchymaler Zellen sowie hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zellen werden durch mTORi gehemmt<sup>39</sup>.

Heute gehören die Immunsuppressiva, Sirolimus (Rapamune<sup>®</sup>) und Everolimus (Certican<sup>®</sup>), Derivate des Sirolimus, zu den mammalian-Target-of-Rapamycin-Inhibitoren (mTORi). Die Bezeichnung Target-of-Rapamycin (TOR) stammt aus dem Englischen und bezieht sich auf den Inhibitor Rapamycin<sup>38</sup>. Die beiden mTORi sind Makrolide mit verwandten Wirkmechanismen, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Halbwertszeit. Das Everolimus weist dabei im Vergleich zum Sirolimus einen kürzeren Wert auf. Weiterhin kann sich ersteres besser im Gewebe verteilen und weist somit eine höhere Bioverfügbarkeit auf<sup>40</sup>. Ihre Wirkung entfalten die Immun-

suppressiva über die Bindung des Immunophils der FKBP-Familie, wodurch es zur Blockade des mTORs kommt, einer Serin-/Threonin-Kinase. Konträr zu den CNI, die die Produktion von Zytokinen inhibieren, hemmen mTORi die Wirkung der Zytokine auf die Zielzelle über den mTOR-Komplex. Dies bewirkt die Hemmung des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase. Dadurch entsteht die immunsuppressive und anti-proliferative Eigenschaft der mTORi auf T-Zellen und weitere Immunzellen<sup>41</sup>. Das Nebenwirkungsprofil beider mTORi ist ähnlich und mit dem Auftreten von Leukopenie, Thrombopenie, Hyperlipidämie, Ödemen, Proteinurie, Stomatitis und Diarrhoe verbunden. Die mTORi weisen im Vergleich zu CNI jedoch keine Nephrotoxizität auf und zeigten nach Umstellung von CNI auf Everolimus in der Erhaltungstherapie eine Verbesserung der Nierenfunktionswerte. Dennoch war unter mTORi-Therapie die Rejektionsrate erhöht<sup>40 42 43</sup>.

### 1.3.5 Belatacept

Das Belatacept (Nulojix ®) ist seit 2011 durch die Federal Drug Administration (FDA) und die European Medicine Agency (EMA) als neues Immunsuppressivum zugelassen und dient der Prophylaxe von Transplantatabstoßungen. Es findet vorrangig in Kombination mit Corticosteroiden und Mycophenolsäure Anwendung. Das Fusionsprotein besteht aus einer extrazellulären Domäne, dem zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen-4 (CTLA-4) und einer Fc-Domäne des Immunglobulins (Ig) G1. Das Protein CTLA-4 wird neben weiteren kostimulatorischen Molekülen, wie CD28, auch auf den T-Zellen exprimiert, ist jedoch ein negativer Regulator der T-Zellaktivierung. Das Belatacept bindet als modifiziertes CTLA-4-Ig CD80 und CD86 auf den APCs in höherer Affinität als das CTLA-4. Dies führt zur Inhibition der CD28-vermittelten Ko-Stimulation der T-Zellen. Als Transmitter der Immunantwort gegen transplantierte Organe spielen aktivierte T-Zellen eine zentrale Rolle. Dieser Signalweg wird durch Belatacept inhibiert<sup>44</sup>. Die BENEFIT- (Belatacept-Evaluation-of-Nephroprotection-and-Efficacy-as-First-Line-Immunosuppression-Trial) und BENEFIT-EXT-Studie (BENEFIT-Extended-Criteria-Donors), zwei multizentrische, randomisierte und kontrollierte Phase-III-Studien, zeigten in de-novo-Transplantatempfängern die Spenderorgane nach Standardkriterien (BENEFIT) und erweiterten Kriterien (BENEFIT-EXT) erhielten – sowohl unter Therapie mit Belatacept in niedriger und höherer Dosierung als auch unter Gabe von Cyclosporin A – nahezu gleiche 1-Jahres-Patienten- und Transplantatüberlebensraten (niedrige Dosierung: 97 %, hohe Dosierung: 95 % und CyA: 93 %). Doch unter Belatacept-Therapie war die Nierenfunktion gegenüber CNI-Therapie deutlich besser (GFR: 63, 65 und 50 ml/min pro 1,73 m<sup>2</sup>,  $p = 0,001$ ). Auch im Langzeitverlauf nach sieben Jahren zeigte sich eine Verbesserung der GFR in den beiden Belatacept-Gruppen mit Zu-

nahme der GFR um +0,2 ml/min pro 1,73 m<sup>2</sup> und +0,38 ml/min pro 1,73 m<sup>2</sup>. Hingegen nahm sie in der CyA Gruppe ab (-1,92 ml/min pro 1,73 m<sup>2</sup>)<sup>5 45</sup>.

## **1.4 Biomarker und klinische Parameter der Nierenschädigung**

### **1.4.1 Biomarker Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin und Calprotectin**

#### **NGAL – Synthese und Funktionen**

Das neutrophilengelatinase-assoziierte Lipocalin wurde erstmals 1989 durch Allen und Venge entdeckt und gehört zur umfassenden Proteingruppe der Lipocaline. Diese zählen zu den Sekretionsproteinen und besitzen die Eigenschaften, kleine, hydrophobe Moleküle sowie spezifische Zellrezeptoren zu binden und makromolekulare Komplexe zu bilden<sup>46</sup>.

Insgesamt sind drei verschiedene Molekülformen des NGALs im Blut und Urin bekannt, das 25-kDa-Monomer aus einer über Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidkette aus 178 Aminosäureresten, das 45-kDa-Homodimer und das 135-kDa-Heterodimer, das kovalent die Gelatinase (Matrix-Metalloproteinase-9/MMP-9) bindet. Das NGAL wird im Rahmen der Myelopoese im Knochenmark gebildet und direkt in den Granula der neutrophilen Granulozyten abgespeichert. Auch in anderen nichthämatopoetischen Geweben wird mRNA des NGALs produziert, etwa im Dünndarm, der Lunge, der Trachea, dem Pankreas, dem Thymus und dem Nierenepithel, in der Henle-Schleife und dem Sammelrohr<sup>47 48</sup>.

#### **NGAL als Biomarker in der klinischen Forschung**

Es gilt zu untersuchen, ob das NGAL als systemischer und undifferenzierter Entzündungsmarker oder als früher und spezifischer Biomarker für das akute Nierenversagen anwendbar ist.

Die Kreatinin-Konzentration im Blut oder Urin ist als alleinige Referenz für die Diagnostik des akuten Nierenversagens zu unpräzise. Allgemein führen Komorbiditäten und chronische Niereninsuffizienz zu einer Erhöhung des NGALs im Serum oder Urin. So haben Mishra et al. bei Kindern das NGAL eher als Prädiktor für ein akutes Nierenversagen eingesetzt, da hier seltener Komorbiditäten auftreten<sup>49</sup>. Des Weiteren kann der NGAL-Wert als Prädiktor nur dann herangezogen werden, wenn zum Baseline-Zeitpunkt eine normale Nierenfunktion vorliegt. Auch besteht kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des akuten Nierenversagens und einem direkten Anstieg des Biomarkers NGAL bei Notaufnahme-Patienten. Studien zeigen, dass NGAL im Urin nur dann als spezifischer Biomarker für das akute Nierenversagen für Patienten mit oder ohne chronische Niereninsuffizienz gilt, wenn keine weiteren systemischen Entzündungen oder

Multiorganversagen vorliegen. Jedoch ist in Studien mit septischen Patienten aus der Notaufnahme eine hohe Sensitivität (0,96) für das NGAL im Plasma festzustellen, aber eine geringere Spezifität für NGAL als Prädiktor eines akuten Nierenversagens. Liegt eine systemische Entzündung vor, wie bei einer Sepsis, ist das Risiko für das Auftreten des akuten Nierenversagens erhöht. Das NGAL kann aus den Granulae der neutrophilen Granulozyten oder aus nichthämatopoetischen Zellen der Lunge und Leber sezerniert werden. Hierdurch kann es sowohl im Plasma als auch im Urin zum Anstieg des NGALs kommen – unabhängig von einer Nierenschädigung. Liegt diese jedoch vor, ist der Anstieg des NGALs im Urin auf die verminderte Reabsorption durch Megalin-Cubulin Rezeptoren im proximalen Tubulus und die gesteigerte NGAL-Produktion in geschädigten Nierentubuluszellen des distalen Nephrons zurückzuführen. Die Zunahme der homodimeren Form des NGALs im Urin und die Korrelation zwischen dem Anstieg des NGALs und dem Zeitpunkt des Einsatzes des kardiopulmonalen Bypasses lässt darauf schließen, dass die Sekretion des NGALs aus den neutrophilen Granulozyten erfolgt und nicht aus den Nierentubuluszellen.

### **NGAL bei nierentransplantierten Patienten**

Bei Untersuchungen an nierentransplantierten Patienten ist die verzögerte Transplantatfunktion/delayed-graft-function (DGF) eine häufige Komplikation in der frühen Posttransplantationsphase und erfordert eine frühzeitige Therapie durch die Dialyse<sup>50</sup>. Die DGF ist definiert als ein Zeitraum von sieben Tagen nach der Transplantation, innerhalb dessen eine Dialyse notwendig wird<sup>51</sup>. Da es im Serum zur verzögerten Zunahme des Kreatinins kommt, hat sich für die Detektion einer DGF innerhalb von 24 Stunden nach Transplantation die NGAL-Bestimmung im Blut und im Urin als hilfreich erwiesen. Im Blut ist dies mit einem Area-under-curve(AUC-)-Wert von 0,95 sogar aussagekräftiger als im Urin mit einem AUC-Wert von 0.91. Auch die Studie von Buemi et al. bestätigte die erhöhte Zuverlässigkeit des Plasma-NGAL-Wertes gegenüber dem Urin-NGAL-Wert<sup>52 53</sup>.

### **Calprotectin**

#### **Synthese und Funktion**

Das Calprotectin ist Mitglied der S100-Superfamilie und wird daher auch als S100A8 (Calgranulin A) und S100A9 (Calgranulin B) oder als MRP8/14 (myeloid-related-protein) bezeichnet, das sich zu einem Heterodimer zusammensetzt. Es gehört zu den intrazellulären Calcium- und Zinkbindenden Proteinen, die von aktivierten Phagozyten, den neutrophilen Granulozyten, den dendritischen Zellen und Monozyten, sezerniert werden. Keratinozyten, Osteoklasten und Makropha-

gen sowie mikrovaskuläre Endothelzellen und Fibroblasten können die Expression von Calprotectin stimulieren. Das Calprotectin übernimmt entscheidende Funktionen bei der angeborenen Immunität, indem es als Alarmin oder damage-associated-molecular-pattern (DAMP) fungiert. Diese intrazellulären Proteine werden bei Zellschäden in den Extrazellulärraum abgegeben und führen zur Bindung der pattern-recognition-receptors (PRRs), zu denen der Toll-like-receptor 4 (TLR4) auf Monozyten gehört. Vor allem auf Tumorzellen kann das Calprotectin auch den Rezeptor für Advanced-glycation-end-products (RAGE) binden. Hierbei bindet das S100A9 mit einer größeren Affinität in Gegenwart von Calcium oder Zink den Rezeptor für RAGE<sup>54</sup>. Dieses gehört zu den PRRs und ist auf vielen Geweben anzutreffen, auch in der Bowman-Kapsel, auf Podozyten, proximalen Tubuluszellen und renalen Mesangiumzellen. Es wird mit chronischen Nierenerkrankungen assoziiert<sup>55 56</sup>. Für den frühen Nachweis einer Nierenschädigung wurde in einem Ischämie-Reperfusion-Modell an Ratten die Genexpression für Calprotectin nach 30-minütiger Ischämiezeit gemessen. Nach 3-stündiger Reperfusion zeigte sich eine Hochregulation der Gene für das Calprotectin/S100A8 und S100A9 um jeweils das 3,1- und 7,5-fache<sup>57</sup>.

### **Calprotectin als Biomarker in der klinischen Forschung**

Das Calprotectin ist für die Diagnostik pathophysiologischer Prozesse sowie Reparaturprozesse der Niere ein vielversprechender Marker<sup>58</sup>. In klinischen Studien konnte durch die Calprotectin-Bestimmung im Urin die Unterscheidung zwischen dem prärenalen und intrinsischen akuten Nierenversagen erfolgen. Die Studie führte Untersuchungen an Patienten mit einem akuten Nierenversagen im Stadium 1–3 nach Einteilung des Acute-Kidney-Injury-Network (AKIN) durch. Mit einer Sensitivität von 92,3 % und einer Spezifität von 97,1 % eignete sich die Urinbestimmung von Calprotectin für die Diagnostik des akuten intrinsischen Nierenversagens<sup>59</sup>.

Eine weitere Studie von Ebbing et al. untersuchte die Calprotectin- und auch NGAL-Konzentration im Urin. Es wurde nach iatrogen provozierte Ischämie durch Abklemmen einer Nierenarterie im Rahmen einer Nierentumor-Operation eine erhöhte Calprotectin- und NGAL-Konzentration festgestellt. Das Maximum wurde nach 48 Stunden erreicht und fiel danach wieder ab<sup>60</sup>.

## **Calprotectin bei nierentransplantierten Patienten**

Studien an nierentransplantierten Patienten sollten zudem überprüfen, ob sich das Calprotectin zur frühen Diagnostik pathophysiologischer Prozesse nach Nierentransplantationen eignet. So haben Burkhardt et al. in ihrer Studie zur akuten Rejektion zunächst an 20 Patienten die Serumkonzentration des Calprotectin 28 Tage nach Nierentransplantation gemessen. In den ersten zwei Wochen kam es zu einem Anstieg der Calprotectin-Konzentration im Serum der Patienten mit akuter Rejektion. Ein Cut-Off-Wert von 4,2 µg/ml erbrachte eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 67 % für die Diagnose der akuten Rejektion. Erhöhte Calprotectin-Werte gingen um einen Median von 5 Tagen der akuten Abstoßung voraus, wobei der Anstieg auf die Infiltration des Transplantatgewebes mit Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen zurückzuführen war<sup>61</sup>.

Auch Tepel et al. haben in ihrer multizentrischen, prospektiven Studie an 144 nierentransplantierten Patienten untersucht, ob das Calprotectin im Urin die Prädiktion des akuten Transplantatversagens nach Nierentransplantation ermöglicht. Dabei war festzustellen, dass die Calprotectin-Konzentration, gemessen an der GFR im Urin am ersten Tag, einen Monat, sechs Monate und zwölf Monate nach einer Nierentransplantation das akute Transplantatversagen vorhersagte. Die Studie bestätigte die Assoziation zwischen erhöhter Calprotectin-Konzentration im Urin und einer beeinträchtigten Transplantatfunktion<sup>62</sup>.

### **1.4.2 Klinische Parameter**

Zur Verlaufskontrolle werden nach einer Transplantation zu festgelegten Zeitpunkten klinische Parameter im Heparin-Plasma bestimmt, darunter die GFR (in ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) und die Proteinurie (Albumin/Kreatinin-Ratio) im Spontanurin. Diese dienen der Evaluation der Nierenfunktion und Schädigung der Nierenstruktur. Anhand der Serumkreatininwerte erfolgt mithilfe der Chronic-Kidney-Disease-Epidemiology-Collaboration-Formel (CKD-EPI) nach Levey et al. die Berechnung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)<sup>63</sup>. Die Angabe des Wertes erfolgt in der Einheit ml/min und ist auf eine standardisierte Körperoberfläche von 1,73 m<sup>2</sup> bezogen. Die GFR gilt neben der Nierenbiopsie als der aussagekräftigste Wert hinsichtlich der Bewertung einer gesunden Nierenfunktion und einer beginnenden Niereninsuffizienz. Hierbei werden Faktoren wie Geschlecht, Hautfarbe, Alter, Ethnie sowie der Serumkreatininwert herangezogen, wobei zwischen männlichen und weiblichen Patienten differenziert wird. In der Transplantationsdatenbank, Tbase2, wurden labormedizinische Daten, Änderungen der Medikation, das Vorkommen von Rejektionen und Überlebensdaten erfasst und entnommen.

## 1.5 Fragestellung

Die immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantationen ist einer der essenziellsten Pfeiler der Transplantationsmedizin. Dabei stellt die optimale Einstellung der Immunsuppression eine Herausforderung dar. Damit sollen Rejektionen vermieden und die von den Immunsuppressiva ausgehende Toxizität möglichst gering gehalten werden. Während die Standardimmunsuppression unter CNI und mTORi häufig mit einem ungünstigen Nebenwirkungsprofil verbunden ist, stellt die Therapie unter Belatacept eine vielversprechende Alternative dar.

In der vorliegenden Arbeit soll eine Gegenüberstellung des Ko-Stimulationsblocker Belatacept mit der konventionellen CNI und mTORi geboten werden. Anhand des Zytokinprofils soll der Einfluss von Belatacept, CNI und mTORi auf die Modulation der Zytokine neun Monate nach Konversion auf Belatacept sowie unter Standardimmunsuppression bestimmt werden. Hierbei soll die Nierenfunktion anhand der Biomarker NGAL im Plasma und Calprotectin im Serum nach der Umstellungstherapie auf Belatacept untersucht werden. Die Messung der Biomarker erfolgte zum Baseline-Zeitpunkt und bis zu drei Monate danach.

Im Kontext der Therapie unter Belatacept und Standardimmunsuppression an nierentransplantierten Patienten sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welches Zytokinprofil lässt sich nach Konversion auf Belatacept im Vergleich zu den konventionellen Immunsuppressiva erkennen? Welcher Shift des Zytokinprofils ist zu erkennen?
2. Welchen Effekt haben Belatacept und die konventionelle Immunsuppression unter CNI und mTORi auf die Biomarker NGAL und Calprotectin? Wie entwickeln sich die konventionellen klinischen Parameter GFR und Proteinurie?

## **2 Methoden und Material**

### **2.1 Ablauf der Studie**

#### **2.1.1 Probandenkollektiv und Kontrollgruppe**

Das Probandenkollektiv der nichtrandomisierten, prospektiven, kontrollierten und explorativen Interventionsstudie bestand aus insgesamt 38 nierentransplantierten Patienten. Im Rahmen der Studie wurde die Konversion des CNI- und mTORi-basierten Therapieregimes auf Belatacept der konventionellen Therapie mit CNI und mTORi gegenübergestellt. Die Konversionsgruppen, B1 mit n = 10 Patienten und B2 mit n = 9 Patienten, wurden mit jeweils gleicher Anzahl an Kontrollpatienten (K1 = 10 Patienten, K2 = 9 Patienten) verglichen und bezüglich ihres Alters, Geschlechts und ihrer Nierenfunktion abgeglichen. Ziel der Studie war u. a. die Bestimmung von Zytokinen nach Konversionstherapie gegenüber der konventionellen Therapie sowie die Bewertung der Biomarker NGAL und Calprotectin als prognostische Prädiktoren der Nierenschädigung.

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 ihr schriftliches Einverständnis zum Studienvorhaben.

Die Studiendauer erstreckte sich von November 2013 bis März 2016. Die Patienten wurden zu diesem Zweck am Studienbeginn aufgeklärt und unterzeichneten eine Einwilligungserklärung, mit der sie der Blutentnahme und der anonymisierten Verarbeitung ihrer Daten zustimmten.

Im Anschluss an das Screening erfolgte die Blutentnahme zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses in der Klinik für Nephrologie der Charité Berlin am Campus Mitte im Studienbüro. Hierfür wurde ein Kit aus 10 ml-Serum-Röhrchen, 6 ml-EDTA-Plasma-Röhrchen und Urinproben für das Forschungslabor der Nephrologie bereitgestellt.

Das EDTA-Plasma, das Serum sowie der Urin wurden spätestens nach vier Stunden verarbeitet.

Das EDTA-Plasma-Röhrchen wurde bei Raumtemperatur (RT) und Dunkelheit gelagert und bei 3000 U/Min (Umdrehungen pro Minute) für 10 min (Minuten) zentrifugiert. Das Serum wurde

hingegen bei ca. 5 °C dunkel gelagert, bis es für 5 min zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das gewonnene Plasma und das Serum bei ca. -80 °C tiefgekühlt.

Das Monitoring der Patienten während der Studie sah vier Visiten vor, wobei je nach Visite unterschiedliche klinische Parameter erhoben wurden. Für die Untersuchungen und Auswertungen waren folgende Visiten relevant:

Visite 1: Baseline-Zeitpunkt

Visite 2: Monat 3

Visite 3: Monat 6

Visite 4: Monat 9

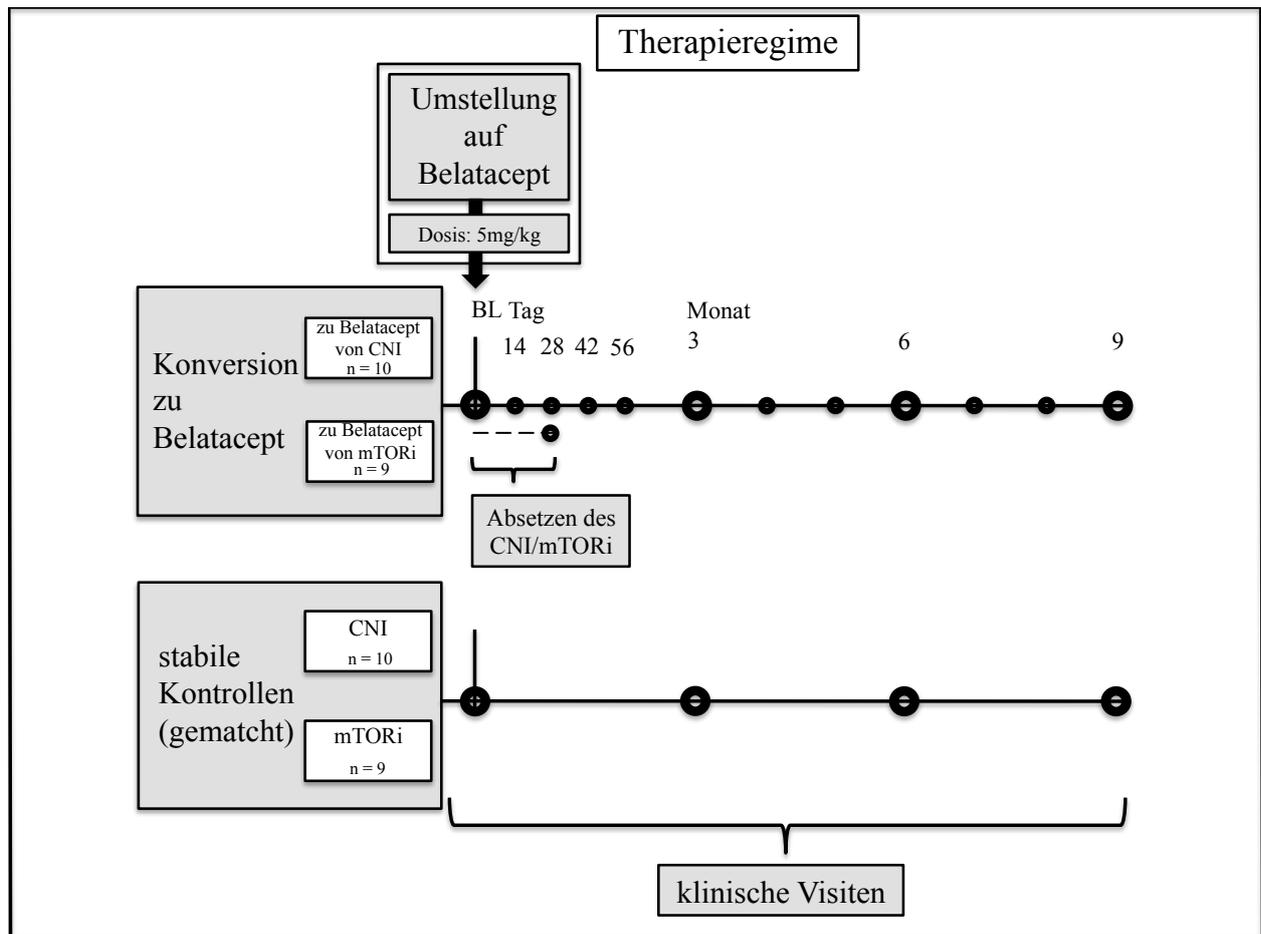


Abbildung 2. Therapieregime der Studienteilnehmer: Konversionsgruppe B1 und B2 (zu Belatacept von CNI n = 10, zu Belatacept von mTORi n = 9), stabile und gematchte Kontrollgruppe K1 und K2 (CNI n = 10, mTORi n = 9), mTORi, mammalian-Target-of-Rapamycin-Inhibitor; CNI, Calcineurininhibitor; Dosis von 5 mg/kg zum Baseline-Zeitpunkt (BL), am 14. Tag, 28. Tag, 42. Tag, 56. Tag und alle 4 Wochen, klinische Visiten: BL, Monat 3, 6 und 9.

Die Immunsuppression nach dem Baseline-Zeitpunkt bestand in der Konversionsgruppe B1 sowie B2 aus Belatacept (Nulojix), Mycophenolat (z. B. MMF, z. B. CellCept®) oder EC-MPS (z. B. Myfortic®) und Corticosteroiden (z. B. Urbason®). Innerhalb der stabilen Kontrollgruppe K1 wurde ein CNI-Präparat verabreicht, z. B. Cyclosporin (z. B. Sandimmun Optoral®) oder Ta-

crolimus (z. B. Prograf®), Mycophenolat und Steroide, wohingegen sie innerhalb der stabilen Kontrollgruppe K2 ein mTORi-Präparat, z. B. Everolimus (z. B. Certican®) oder Sirolimus (z. B. Rapamune®), Mycophenolat und Steroide beinhaltete. Die Verabreichung des Belatacept erfolgte intravenös mit einer Dosis von 5 mg/kg zum Baseline-Zeitpunkt, am 14., 28., 42. und 56. Tag nach BL und anschließend mit einer regelmäßigen Gabe alle 4 Wochen bis zum Studienende. Die Dosierung orientierte sich an dem aktuellen Gewicht des Patienten und wurde bei Änderungen von größer als  $\pm 10\%$  angepasst. Hierbei sollte die Infusionsdauer konstant 30 min betragen. Das Reduktionsschema des CNI und mTORi wurde wie folgt schrittweise umgesetzt:

Tabelle 1. Reduktionsschema von CNI

Baseline-Zeitpunkt	Reduktion der CNI-Dosis um 50 %
Nach 2 Wochen	Reduktion des CNI um weitere 25 %
Nach 4 Wochen	vollständiges Absetzen des CNI

Tabelle 2. Reduktionsschema von mTORi

Baseline-Zeitpunkt	Reduktion der mTORi-Dosis auf 50 % – 75 %
Nach 2 Wochen	Reduktion des mTORi auf 25–50 %
Nach 4 Wochen	vollständiges Absetzen des mTORi

Die Dosis des Mycophenolats ( $\geq 1$  g/d Mycophenolatomofetil oder  $\geq 720$  mg/d Enteric-coated Mycophenolsäure) und der Corticosteroide entsprach der initialen Dosis. Sie blieb unverändert, wurde aber unter entsprechender klinischer Indikation angepasst.

### **Einschluss- und Ausschlusskriterien der Konversionsgruppe**

Die Aufnahme der Patienten mit geplanter Konversion auf Belatacept in die Studie erfolgte nach Überprüfung definierter Ein- und Ausschlusskriterien. Diese sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 3. Ein- und Ausschlusskriterien für die Konversionsgruppen.

Einschlusskriterien für die Konversionsgruppe	Ausschlusskriterien für die Konversionsgruppe
Nierentransplantation vor > 3 Monaten	Patienten mit psychischen Störungen oder mangelnder Compliance
mindestens dreimonatige Erhaltungstherapie auf CNI-	Patienten mit Indikation zur fortlaufenden Therapie mit

oder mTORi-Basis und daraufhin Zeichen einer CNI-Toxizität oder mTORi-Intoleranz mit klinischer Indikation der Konversion auf eine CNI- und mTORi-freie Immunsuppression mit Belatacept	CNI oder mTORi
akzeptable Nierenfunktion, Serumkreatininwert unter 4 mg/dl	Transplantatempfänger mit negativer oder unbekannter serologischer Beurteilung des Epstein-Barr-Virus wie auch Multiorganempfänger (ein Organ oder Knochenmark)
bei Erst- oder Zweittransplantation der Niere ABO-kompatible Lebend- oder Todspende	Patienten mit schwerer Abstoßung (> Banff II akute Rejektion), einer repetitiv auftretenden akuten Abstoßung oder einer steroidresistenten Abstoßung innerhalb von sechs Monaten nach Studieneinschluss
Patienten mit geringerem bis mittlerem immunologischen Risiko mit einem PRA-Wert unter 30 % vor der Transplantation	Frauen im gebärfähigen Alter, die gravide waren, stillten, mit Graviditätsplanung oder positiven Graviditätstest im Urin oder Serum
begleitende Therapie mit Mycophenolsäure (> 1 g/d MMF oder > 710 mg/d EC-MPS)	Patienten mit bedeutenden medizinischen Begleiterkrankungen beispielsweise eine Leberzirrhose, symptomatische kongestive Herzfehler oder klinisch relevante aktive Infektionen (z. B. bekannte Infektionen mit Hepatitis B, Hepatitis C, HIV, CMV oder BK-Virus)
Patientenalter > 18 Jahre	Patienten mit Malignomen, ausgenommen Patienten mit lokal, nichtinvasiv und vollständig exzidierten: Basalzell- oder Plattenepithelkarzinom
Frauen im gebärfähigen Alter: Anwendung von zwei adäquaten Kontrazeptionsmethoden, um Gravidität während der Studie oder das Risiko einer Gravidität acht Wochen nach der letzten Gabe des Studienmedikation zu minimieren	vorangegangene Behandlung mit einem Studienmedikament drei Monate vor Studienbeginn
Frauen im gebärfähigen Alter: negatives Ergebnis des Serum- und Urintest 72 Stunden vor Studienbeginn	Studienteilnahme mit Medikation, die drei Monate vor Studienbeginn stattgefunden hat sowie eine, die dem Studienbeginn um drei Monate vorausging

mTORi, mammalian- Target-of-Rapamycin-Inhibitor; CNI, Calcineurininhibitor; PRA, panel reactive antibody; MMF, Mycophenolat-Motefil; EC-MPS, Enteric-coated Mycophenolate Sodium-/Natrium-Mycophenolat; HIV, Humanes Immundefizienz-Virus; CMV, Cytomegalovirus; BK-Virus, Humanes Polyomavirus.

Die Aufnahmekriterien für die Kontrollgruppe sind in Tabelle 4 dargelegt.

Tabelle 4. Ein- und Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppen.

Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe	Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppe
Patientenalter > 18 Jahre	Patienten mit psychischen Störungen oder mangelnder Compliance
Nierentransplantation vor > 3 Monaten	Transplantatempfänger mit negativer oder unbekannter serologischer Beurteilung des Epstein-Barr-Virus
mindestens dreimonatige Erhaltungstherapie auf CNI- oder mTORi-Basis, ohne Zeichen einer CNI-Toxizität oder mTORi-Intoleranz	Multiorganempfänger (ein Organ oder Knochenmark)
Patienten, die die Einverständniserklärung unterzeichnet haben und die Compliance besitzen	Patienten mit schwerer Abstoßung (> Banff II akute Rejektion), einer repetitiv auftretenden akuten Abstoßung oder einer steroidresistenten Abstoßung innerhalb von sechs Monaten nach Studieneinschluss
Frauen im gebärfähigen Alter: negatives Ergebnis des Schwangerschaftsserum- und Urintest eine Woche vor Therapiebeginn, Anwendung von einer adäquaten Kontrazeptionsmethode	Frauen im gebärfähigen Alter, die gravide waren, stillten, mit Graviditätsplanung oder positiven Graviditätstest im Urin oder Serum
akzeptable Nierenfunktion, Serumkreatininwert unter 4 mg/dl	Patienten mit Malignomen, ausgenommen Patienten mit lokal, nichtinvasiv und vollständig exzidierten: Basalzellkarzinom oder Plattenepithelkarzinom
bei Erst- oder Zweittransplantation der Niere ABO-kompatible Lebend- oder Todspende	Patienten mit bedeutenden medizinischen Begleiterkrankungen, wie eine Leberzirrhose, symptomatische kongestive Herzfehler oder klinisch relevante aktive Infektionen (z. B. bekannte Infektionen mit Hepatitis B, Hepatitis C, HIV, CMV oder BK-Virus)
Patienten mit geringem immunologischen Risiko mit einem PRA-Wert unter 30 % vor der Transplantation	vorangegangene Behandlung mit einem Studienmedikament drei Monate vor Studienbeginn
begleitende Therapie mit Mycophenolsäure (> 1 g/d MMF oder > 710 mg/d EC-MPS)	

mTORi, mammalian- Target-of-Rapamycin-Inhibitor; CNI, Calcineurininhibitor; PRA, panel reactive antibody; MMF, Mycophenolat-Motefil; EC-MPS Enteric-coated Mycophenolate Sodium/ Natrium-Mycophenolat; HIV, Humanes Immundefizienz-Virus; CMV, Cytomegalovirus; BK-Virus, Humanes Polyomavirus.

## 2.2 ELISA

### 2.2.1 Sandwich-ELISA

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay) ist die Bezeichnung für ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen oder Makromolekülen in Serum, Urin, Plasma oder in ande-

ren Körperflüssigkeiten. Das Prinzip dieses Nachweisverfahrens beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion.

Beim Sandwich-ELISA wird das Antigen, das Analyt – ähnlich einem Sandwich – an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen/Epitopen von zwei spezifischen Antikörpern gebunden, dem immobilisierten Fänger-Antikörper auf der Mikrotiterplatte und dem Detektions-Antikörper. Bindet der enzymgekoppelte spezifische Detektions-Antikörper das Antigen, geht das Enzym nach Addition des Substrats eine enzymatische Farbreaktion ein, was eine Adsorption des Lichts im Photometer bewirkt und quantitative Aussagen über die Analytkonzentration ermöglicht. Hierbei ist die Enzymaktivität und somit der Farbumschlag proportional zur Analytkonzentration.

### **2.2.2 NGAL**

Für die quantitative Analyse wurde das NGAL-Rapid-ELISA-Kit (Bioporto) verwendet. Als Untersuchungsmedium für die NGAL-Bestimmung dienten Plasmaproben, die zum BL-Zeitpunkt und drei Monate nach Studienbeginn in der Konversionsgruppe B1 und B2 entnommen wurden. In den Kontrollgruppen K1 und K2 wurden Plasmaproben vom Baseline-Zeitpunkt und drei Monate später untersucht. Diese wurden zunächst zentrifugiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Für den ELISA-Test wurden die aufgetauten Plasmaproben 1:100 mit dem Sample Diluent Concentrate verdünnt und jeweils 50 µl auf die bereits mit Fängerantikörpern gegen humanes NGAL beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Die erste Reihe der Mikrotiterplatte führte stets die Standardreihe mit Volumina von jeweils 50 µl mit bekannten Konzentrationen für die Erstellung der Standardkurve. Anschließend wurden 50 µl des HRP-konjugierten NGAL-Antikörpers, dem Detektions-Antikörper, hinzupipettiert und es folgte eine 30-minütige Inkubationszeit bei 200 U/min auf einem Mikrotiterschüttler bei Raumtemperatur in Dunkelheit.

Nach der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Mikrotitervertiefungen verworfen und jedes Well mit jeweils 300 µl Waschlösung behandelt, um Überschüsse ungebundener Substanzen zu entfernen. Hierfür waren insgesamt drei Waschvorgänge erforderlich. Jeweils 100 µl des TMB-Substrats (Tetramethylbenzidin) wurden in die Vertiefungen gegeben. Dieses reagierte mit dem HRP-Enzym (horseradish peroxidase, HRP) und initiierte eine Farbreaktion. Diese wurde durch 100 µl Schwefelsäurelösung gestoppt und anschließend die Farbintensität photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt, wobei sie von der Konzentration des NGAL in den einzelnen Vertiefungen abhing. Da im Versuchsablauf alle Plasmaproben und Standardproben in Doppelreihen gemessen werden, sollte der Variationskoeffizient (CV %) 12,9 % nicht überschritten werden, andernfalls wurde eine erneute Messung der jeweiligen Probe erforderlich.

### **2.2.3 Calprotectin**

Für die Quantifizierung der Konzentration von Calprotectin im Serum wurde das Human-Calprotectin(MRP8/14)-ELISA-Kit (PromoKine) eingesetzt. Für die Messung dienten Serumproben, die in den Gruppen B1, B2, K1 und K2 zum BL-Zeitpunkt und drei Monate nach Studienbeginn entnommen wurden. Die Proben wurden zunächst bei 3000 U/min zentrifugiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Der gesamte Versuchsablauf lief bei einer Raumtemperatur von 23 °C ab. Auf die bereits beschichtete Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl der Standardreihe, der 1:100 verdünnten und bereits zuvor aufgetauten Proben und der Kontrollproben in Doppelreihen in die Vertiefungen, pipettiert und für 30 min inkubiert. Daraufhin wurde der Waschschrift fünf Mal mit 250 µl Waschlösung pro Vertiefung wiederholt und danach 100 µl des Enzym-gekoppelten (Peroxidase) Detektions-Antikörpers pro Vertiefung zugegeben. Während der 30-minütigen Inkubationszeit konnte der Fänger-Antikörper-Calprotectin-Detektions-Antikörper-Komplex entstehen. Nach fünfmaligem Waschen mit 250 µl Waschlösung pro Vertiefung waren alle nicht-gebundenen Substanzen aus den Vertiefungen entfernt. Die Zugabe von 100 µl des TMB-Substrates pro Vertiefung bewirkte die enzymatische Farbreaktion innerhalb der 10- bis 20-minütigen Inkubationszeit in Dunkelheit. Nun reagierte das Enzym Peroxidase, das an den Detektions-Antikörper gekoppelt ist, mit dem TMB zu einem blauen Farbkomplex. Die Farbintensität war dabei von der Konzentration des gebundenen Detektions-Antikörpers an das Calprotectin im Serum abhängig. Diese Reaktion wurde durch 100 µl Schwefelsäurelösung pro Vertiefung beendet und mündete in einen Farbumschlag von blau nach gelb. Anschließend wurde die Farbintensität bei einer Referenzwellenlänge von 450 nm zu 620 nm photometrisch gemessen. Bei den daraus resultierenden Absorptionswerten durfte der Variationskoeffizient (CV %) der Doppelbestimmungen den Wert 7,9 % nicht überschreiten.

### **2.3 Multiplex**

Die Multiplex-Analyse ermöglicht die gleichzeitige quantitative Bestimmung von mehreren Analyten, z. B. von Chemokinen und Zytokinen, in einem geringen Probenvolumen.

Aus dem Plasma der Studienpatienten erfolgt simultan die quantitative Bestimmung von sekretorischen Proteinen, wie von Chemokinen und Zytokinen.

Die Methode basiert auf der Verwendung von Polystyrol-Mikropartikeln (Ø 5,6 µm), die in unterschiedlichen Intensitäten im infraroten und roten Bereich gefärbt sind und fluoreszieren. Jedes der Mikropartikel trägt einen Fänger-Antikörper, der spezifisch den Analyten bindet. An den gebundenen Analyten kann nun der spezifische, biotinylierte Zweitantikörper binden und danach durch an Streptavidin gekoppeltes PE (Phycoerythrin) markiert werden. Im Bio-Plex-200-

System von BioRad erfolgt dies über die durchflusszytometrische Methode. Diese verfügt über zwei Laser, einen roten und einen grünen. Der rote Detektionslaser (635 nm) ermittelt die unterschiedliche Rotfärbung der Mikropartikel. Anhand dieser können die Mikropartikel einer bestimmten Gruppe (Bereich) zugeordnet werden. Der grüne Laser (532 nm) regt das PE an, wobei die Intensität der orangefarbenen Fluoreszenz proportional zum PE-gekoppelten Streptavidin und somit zur Analytenkonzentration ist und die Quantifizierung ermöglicht.

Es werden 25 bis 100 Perlen für jeden Analyten gemessen und die mittlere Fluoreszenzintensität der Mikropartikel angegeben.

### **2.3.1 Multiplex-Verfahren**

Für dieses Verfahren wurde eine Platte mit 96 Vertiefungen benötigt. In jede dieser Vertiefungen der Bio-Plex MCV-Platte wurde, nach Verdünnung der Plasmaproben mit „Human Serum Diluent“ (BioRad) im Verhältnis 1:1, die Lösung eingebracht. Der Ablauf erfolgte nach dem Herstellerprotokoll für die Multiplex-Kits der Firma BioRad zur Messung von Zytokinen und Chemokinen. Daneben wurden die Standardkonzentrationen eines jeden Zytokins und Chemokins nach Verdünnung im Verhältnis 1:2 hinzugefügt. Zunächst erfolgte die Inkubation der Proben und Standardkonzentrationen mit den Mikropartikeln. Es schloss sich der dreimalige Waschvorgang an, um ungebundene Analyte und unwesentliche Elemente aus dem Plasma zu entfernen. Anschließend erfolgte die Zugabe des biotinylierten Zweitantikörpers, der spezifisch den Analyten bindet. Nach dieser Inkubation und einem erneuten Waschvorgang wurde das PE-gekoppelte Streptavidin hinzugegeben, das nun den gebundenen Analyten kenntlich machte. Anhand der spezifischen Standardkurven der einzelnen Analyten konnte nachfolgend die Quantifizierung der Proben stattfinden. Zur Berechnung der Chemokin- und Zytokinkonzentrationen (pg/ml) anhand der Standardkurven wurde die Bio-Plex Manager Software 6.0 herangezogen. Mithilfe des Programms wurden nur diejenigen Werte berücksichtigt, die im linearen Bereich lagen, sowie Werte mit erheblich hoher oder niedriger Konzentration entnommen. Von Relevanz waren Werte im linearen Bereich im Standardkurvenbereich für die Auswertung. Insgesamt wurden über einen Beobachtungszeitraum von neun Monaten 23 Chemokine analysiert. Die Messungen erfolgten zum Baseline-Zeitpunkt, zu Monat drei, sechs und neun in den auf Belatacept konvertierten Patienten (Konversionsgruppen B1 und B2) und in deren Kontrollgruppen K1 und K2. Zu den Analyten des Bio-Plex-Pro-Human-Cytokine-Standard-Kits gehörten folgende Zytokine: CCL24, CCL8, CXCL13, CCL13, CCL1, IL-16, CCL17, CCL21, CCL26, LIF, TPO, SCF, TSLP, IL-33, IL-20, IL-21, IL-23, TRAIL, CTACK, CXCL12, ENA-78, CCL15 und IL-28A.

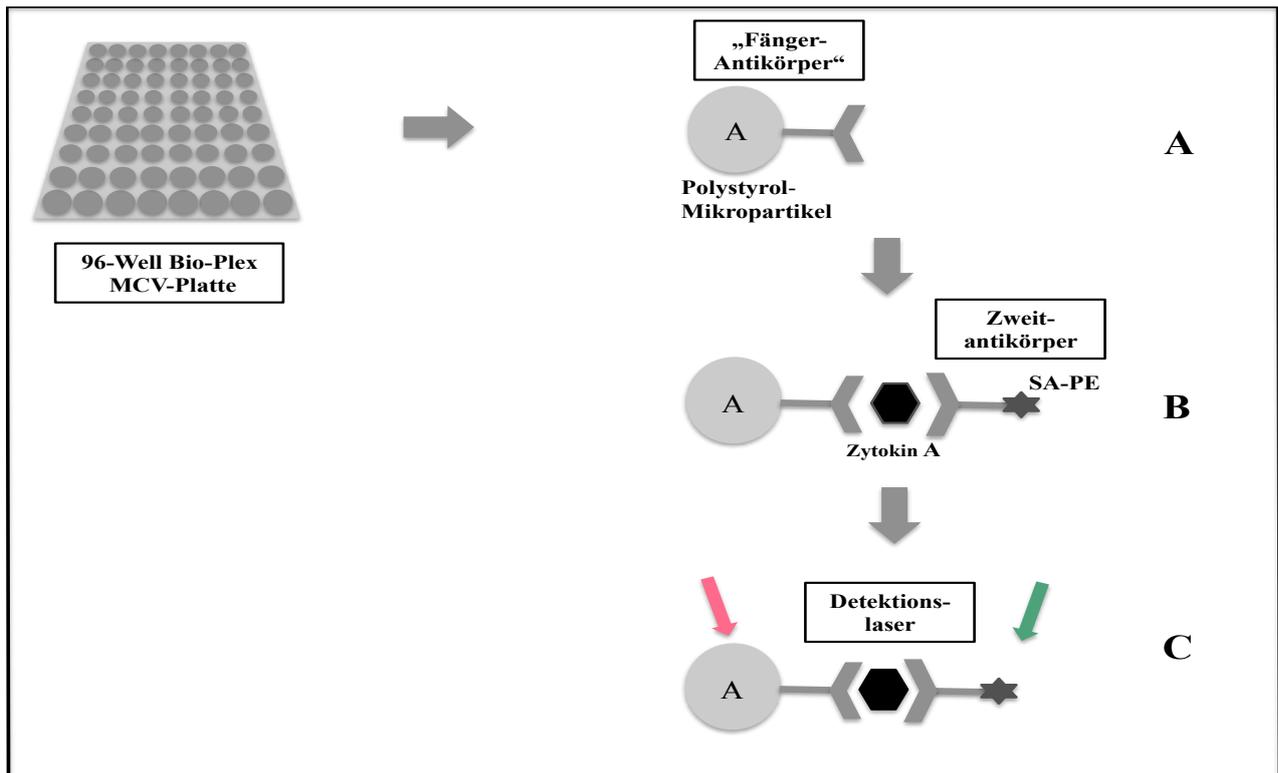


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Multiplex-Analyse, A: Polystyrol-Partikel sind mit spezifischen Antikörpern bestückt; B: analytenspezifischer, biotinylierter Zweitantikörper mit Streptavidin gekoppeltes PE (SA-PE) bindet den Analyten/Zytokin; C: Im Bio-Plex-200-Gerät befindet sich ein roter Detektionslaser, der die individuelle Färbung der Polystyrol-Mikropartikel erkennt. Der grüne Laser markiert simultan die orangefarbene Fluoreszenz des PE-gekoppelten Streptavidins.

## 2.4 Datenverwaltung und statistische Analysen

Die deskriptiven und explorativen Analysen erfolgten mithilfe der Programme Microsoft Excel 2011 und IBM SPSS Statistics Version 26. Die Grafiken wurden im Programm Microsoft Office PowerPoint 2011 angefertigt.

Die Normalverteilung der Variablen wurde anhand des Shapiro-Wilk-Tests und anhand von Histogrammen mit Normalverteilungskurve überprüft. Nach der Annahme einer Nichtnormalverteilung wurden für die weiteren Analysen nichtparametrische Tests herangezogen. Für die statistische Analyse zwischen den zwei verschiedenen Gruppen – den Konversionsgruppen (B1 und B2) und den stabilen, gematchten Kontrollgruppen (K1 und K2) – wurde der unverbundene Test durchgeführt, der Mann-Whitney-U- oder der Chi-Quadrat-Test. Innerhalb einer Gruppe wurde stattdessen der verbundene Test eingesetzt, Wilcoxon. Die Nullhypothese wurde bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  verworfen und somit statistisch ein signifikanter Unterschied festgestellt.

Hierbei führte das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin die statistische Beratung durch.

## 2.5 Übersicht über die verwendeten Materialien

Tabelle 5. Übersicht über die verwendeten Materialien.

Laborgerät	Hersteller
-80°-Gefrierschrank	REVCO (Niederlande)
Kühl-/20°-Gefrierschrank	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Sterilarbeitsbank	Holten (Brannenburg, Deutschland)
Photometer/ELISA Reader	DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter®
Zentrifuge (Megafuge 2.R, Multifuge 3 S-R)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG
Vortex-Mixer	Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, MS2 Minishaker IKA®
Pipetten	Eppendorf-Research (0,5–10 µl; 10–100 µl; 20–200 µl; 100–1000 µl; 500–5000 µl)
Multikanalpipette (Mehrkanalpipette® S-12) (Transferpipette)	BRAND (30–300 µl)
Multistepper/Dispensierpipette (Multipette® plus)	Eppendorf (50–1000 µl) (1–10)
Computer	
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA
SPSS Statistics	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

Tabelle 6. Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Vacutainer: Plasma-Blutentnahmeröhrchen grün (Li-Heparin, 10 ml)	BD (Heidelberg, Deutschland)
Vacutainer: Serum-Blutentnahmeröhrchen orange (6 ml)	BD (Heidelberg, Deutschland)
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG
Einmal-Pipetten: Polystyrene Serological Pipets (10 ml/25 ml)	BD (Heidelberg, Deutschland)
Einmal Pasteurpipetten (3 ml)	VWR, Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Plastikpipettenspitzen	SARSTEDT AG & Co. KG PhysioCare Concept
------------------------	--

Tabelle 7. Chemikalien und Medien.

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
Nukleasefreies Wasser	Ambion, Austin, USA
NGAL Rapid ELISA Kit	Bioporto Diagnostics
Calprotectin (MRP8/14) ELISA Kit, human	PromoKine
Bio-Plex Pro Human Cytokine Standards, Human group II, 1 vial of 23 analytes	Bio-Rad

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der Studienteilnehmer

Die folgenden Tabellen 8 bis 10 sollen den Einfluss der Belatacept-Therapie gegenüber der konventionellen Therapie mit CNI- und mTORi darstellen. Hierbei wurden  $n = 10$  Patienten schrittweise von einem CNI-basierten Regime (Konversionsgruppe B1) sowie  $n = 9$  Patienten von einem mTORi bestehenden Therapieregime auf Belatacept konvertiert (Konversionsgruppe B2). Beiden Gruppen wurde jeweils die gleiche Anzahl an Kontrollpatienten gegenübergestellt (K1 und K2).

Das Transplantat- und Patientenüberleben lag in nach neun Monaten – sowohl in den von CNI und mTORi auf Belatacept konvertierten Gruppen B1 und B2 als auch in den Kontrollgruppen K1 und K2 mit konventioneller Immunsuppression – bei 100 %. Weiterhin trat im Beobachtungszeitraum keine Abstoßung auf.

Die zugrundeliegenden Nierenerkrankungen waren unterschiedlich verteilt (Tabelle 6). Der Grund für die Umstellung innerhalb der Konversionsgruppe B1 war hauptsächlich die CNI-Nephrotoxizität. Daneben war in der Konversionsgruppe B2 die relevanteste Nebenwirkung für die Umstellung die Proteinurie mit 44,4 %.

Die Patientencharakteristika der Konversions- und Kontrollgruppen unterschieden sich lediglich zum Zeitpunkt des Studieneinschluss. Hier wies die Konversionsgruppe B2 statistisch signifikant geringere GFR-Werte auf sowie statistisch signifikant höhere Proteinurie-Werte gegenüber der Kontrollgruppe K2 zum Baseline-Zeitpunkt.

Die Evaluation der weiteren demografischen NTx-Charakteristika zeigte keine statistischen Signifikanzen.

Mit dem Studieneinschluss wurde die Konversionsgruppe B1 von einem CNI-basierten Therapieregime auf Belatacept (Nulojix) konvertiert. Innerhalb der Kontrollgruppe K1 erfolgte die Fortsetzung der konventionellen Therapie mit CNI-Präparaten (z. B. Cyclosporin A, z. B. Sandimmun Optoral) oder Tacrolimus (z. B. Prograf) im Gegensatz zur Gruppe B1 ( $p > 0,99$ ). Die Immunsuppression im Beobachtungszeitraum bestand weiterhin aus Mycophenolaten (z. B. MMF, z. B. CellCept) oder EC-MPS (z. B. Myfortic) und Corticosteroiden (z. B. Urbason). In der Konversionsgruppe B2 erfolgte die Umstellung der Medikation von mTORi auf Belatacept, während die Kontrollgruppe K2 weiterhin unter konventioneller Therapie mit mTORi-Präparaten (z. B. Everolimus, z. B. Certican) oder Sirolimus (z. B. Rapamune) behandelt wurde ( $p > 0,99$ ). Mycophenolate (z. B. MMF, z. B. CellCept) oder EC-MPS (z. B. Myfortic) und Corticosteroide waren ebenfalls Bestandteil der Immunsuppression.

Die detaillierte Darstellung des Medikationsplans mit Belatacept ist der Abbildung 2 zu entnehmen.

Tabelle 8. Grunderkrankungen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses

	<b>B1</b>	<b>K1</b>	<b>B2</b>	<b>K2</b>
	CNI → Belatacept	CNI	mTORi → Belatacept	mTORi
<b>Grunderkrankung, n</b>				
<b>Glomerulonephritis/IgA-Nephropathie</b>	2	3	3	1
<b>Reflux-Nephropathie</b>	2	-	1	1
<b>PKD</b>	4	1	2	2
<b>aHUS</b>	-	-	1	-
<b>Alport-Syndrom</b>	-	1	-	-
<b>Hypertensive Nephropathie</b>	-	1	-	1
<b>Interstitielle Nephropathie</b>	-	-	1	1
<b>Diabetische Nephropathie</b>	1	-	1	-
<b>Unklar</b>	1	4	-	3

PKD, Polyzystische Nierenerkrankung, aHUS, atypisches Hämolytisch-Urämisches Syndrom.

Tabelle 9. Zusatzmedikation zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses

<b>Immunsuppression nach BL</b>	<b>B1</b>	<b>K1</b>	<b>B2</b>	<b>K2</b>
<b>Belatacept</b>	10	-	9	-
<b>Steroide (Methylprednisolon/ Prednisolon)</b>	5	3	3	2
<b>Mycophenolatmofetil/ natrium</b>	10	10	9	9
<b>CNI</b>	-	10	-	-
<b>mTORi</b>	-	-	-	9

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

Tabelle 10. Charakteristika der Patienten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses.

Charakteristika	B1	K1	p-Wert	B2	K2	p-Wert
<b>Anzahl der Patienten (n)</b>	10	10	> 0,99	9	9	> 0,99
<b>Weiblich</b>	1	1	> 0,99	5	5	> 0,99
<b>Alter zum BL-Zeitpunkt, Median, Jahre (Mean ± SD)</b>	51,7 ± 12,2	50,2 ± 12,8	0,85	54,9 ± 21,1	55,4 ± 13	0,97
<b>Zeit zwischen NTx und BL (Jahre), Median, Jahre (Mean ± SD)</b>	6,1 ± 5,8	7,2 ± 4,9	0,74	9,4 ± 4,7	9,3 ± 4,4	0,86
<b>Anzahl NTx:</b>						
<b>1, n</b>	8	10	0,48	9	8	0,73
<b>2, n</b>	2	-	0,48	-	1	0,73
<b>GFR zum BL Zeitpunkt (ml/min), (Mean ± SD)</b>	26,5 ± 26	37,5 ± 13,5	0,17	43 ± 27,5	70 ± 21	<b>*0,01</b>
<b>Proteinurie (Albumin/Kreatinin-Ratio) zum BL Zeitpunkt (mg/L), (Mean ± SD)</b>	137 ± 175,7	100,5 ± 213,1	0,99	245 ± 434,7	92 ± 77,5	<b>*0,04</b>

NTx, Nierentransplantation; IQA, Interquartilsabstand; n, Anzahl der Patienten; BL, Baseline; Konversionsgruppe B1 (n = 10) wurde von CNI auf Belatacept umgestellt; Konversionsgruppe B2 (n = 9) wurde von mTORi auf Belatacept umgestellt; Kontrollgruppe K1 unter CNI; Kontrollgruppe K2 unter mTORi; GFR glomerulären Filtrationsrate; mTORi, mammalian-Target-of-Rapamycin-Inhibitor; CNI, Calcineurininhibitor, Mean ± SD/Mittelwert ± Standardabweichung; Vergleich der Konversionsgruppen B1 und B2 mit ihrer Kontrollgruppe K1 und K2 durch den Mann-Whitney-U-Test, \* p < 0,05.

## Vergleich der konventionellen Immunsuppression mit Belatacept

### 3.1.1 Auswirkung der Immunsuppression auf die Biomarker NGAL und Calprotectin

Über den kompletten Beobachtungszeitraum von drei Monaten zeigten die auf Belatacept konvertierten Patienten (Gruppe B1) im Vergleich zu ihren Kontrollpatienten (Gruppe K1) keine wesentlichen Unterschiede (Abb. A) hinsichtlich der NGAL-Plasma-Konzentration.

Bei der Betrachtung der Patienten, die von mTORi auf Belatacept konvertiert wurden (Abb. B) und deren Kontrollen konnte innerhalb der Konversionsgruppe B2 eine statistisch signifikante Zunahme des NGAL zwischen BL und Monat drei (B2: 166,3 ng/ml; IQA=74,8 ng/ml, M3:270,3 ng/ml; IQA=173,6 ng/ml;  $p=^*0,04$ ) festgestellt werden.

Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe K2 zeigte sich ein deutlicher Unterschied bei den mit Belatacept behandelten Patienten der Gruppe B2 drei Monate nach Studieneinschluss (B2: 270,3 ng/ml (IQA= 173,6) und K2: 145,1 ng/ml (IQA=43,1);  $p=^*0,01$ ).

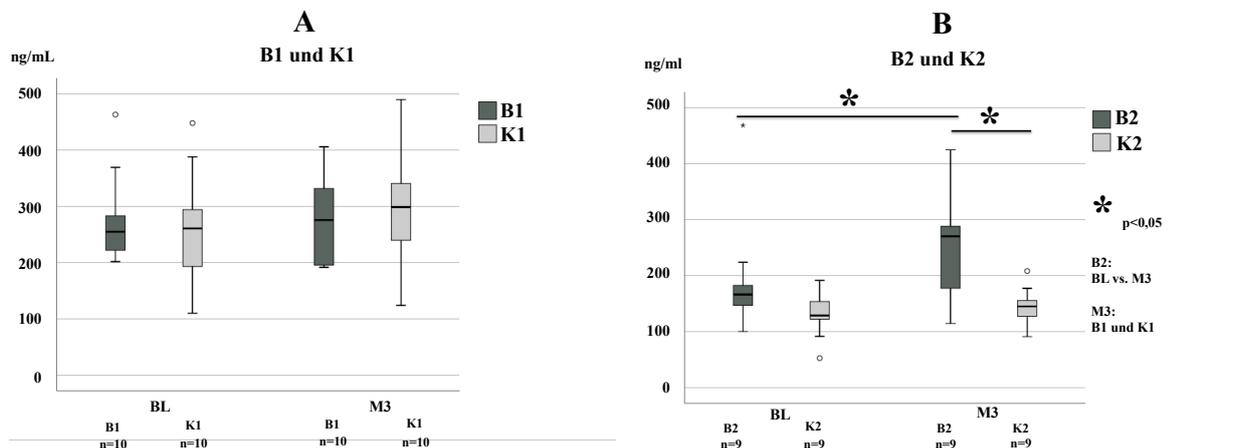


Abbildung 4. NGAL Plasma Konzentration in ng/ml, Konversionsgruppe (B1 n = 10, B2 n = 9) und stabile und gematchte Kontrollgruppe (K1 n = 10, K2 n = 9) über einen Beobachtungszeitraum von drei Monaten nach BL, Abb. A: B1 vs. K1, Abb. B: B2 vs. K2,  $*p \leq 0,05$  zeigt den statistisch signifikanten Unterschied durch den Mann-Whitney-U-Test und den Wilcoxon-Test an.

Tabelle 11. pNGAL Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 im Vergleich zu den Kontrollgruppen K1 und K2.

Messzeitpunkt	B1	K1	p-Wert	B2	K2	p-Wert
	MW ± SD			MW ± SD		
<b>BL</b>	276,2 ± 26,1	256,7 ± 32,9	0,63	191 ± 36,8	131 ± 13,5	0,16
<b>M3</b>	274,9 ± 24,9	285,8 ± 33,7	0,91	255,5 ± 35	144,7 ± 11,4	<b>*0,01</b>

MW ± SD, Mittelwert ± Standardabweichung zum BL (Baseline-Zeitpunkt) und M3 (3 Monate) nach Baseline, Vergleich der Gruppen B1 (n = 10) vs. K1 (n = 10) bzw. B2 (n = 9) vs. K2 (n = 9) mit dem Mann-Whitney-U-Test.

Tabelle 12. Verlauf der pNGAL-Konzentration innerhalb der Konversionsgruppe B1 und B2.

Messzeitpunkt	B1		B2	
	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)
<b>BL</b>	255 (201,9 - 463)	-	166,3 (100,2 – 468,3)	-
<b>M3</b>	275,6 (191,7 – 405,8)	0,721	270,3 (114,4 – 424,6)	<b>*0,04</b>

BL (Baseline-Zeitpunkt), M3 (Monat drei), Median-Werte mit IQA (Interquartilbereich).

## Calprotectin

Der Biomarker Calprotectin sollte neben dem NGAL sowohl in den auf Belatacept konvertierten Patienten (Konversionsgruppe B1 und B2) als auch deren Kontrollgruppen (K1 und K2) untersucht werden.

Die Calprotectin-Konzentration im Serum der Patienten wies bei Gegenüberstellung der Konversionsgruppe B1 (Abb. A) und deren gematchter Kontrolle (Gruppe K1) drei Monate nach Studieneinschluss eine statistische Verminderung, trotz Fortführung der CNI Therapie auf ( $p = 0,02$ ).

Die Calprotectin-Konzentration im Serum der von mTORi auf Belatacept konvertierten Patienten (Gruppe B2) verhielt sich gegenüber deren gematchten Kontrollpatienten (Gruppe K2) vergleichbar (siehe Tabellen 13/14).

Sowohl die Therapie nach Konversion von mTORi auf Belatacept als auch die Standardimmunsuppression unter mTORi zeigten keine statistisch fassbaren Unterschiede (Abb. B).

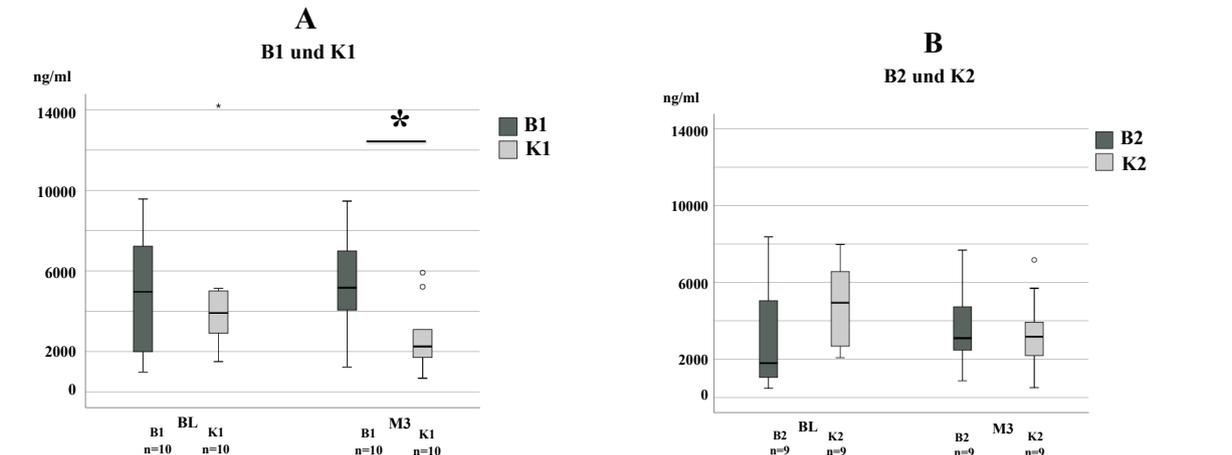


Abbildung 5. Calprotectin Konzentration im Serum in ng/ml, Konversionsgruppe (B1 n = 10, B2 n = 9), stabile und gematchte Kontrollgruppe (K1 n = 10, K2 n = 9) über einen Beobachtungszeitraum von 3 Monaten nach BL, Abb. A: B1 vs. K1, Abb. B: B2 vs. K2, \* $p \leq 0,05$  zeigt den statistisch signifikanten Unterschied durch den Mann-Whitney-U-Test und den Wilcoxon-Test an.

Tabelle 13. sCalprotectin Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und der Kontrollgruppen K1 und K2 durch Mann-Whitney-U-Test bestimmt.

Messzeitpunkt	B1	K1	p-Wert	B2	K2	p-Wert
	MW ± SD			MW ± SD		
Baseline	4838,7 ± 976,5	4684,7 ± 1128,7	0,8	3463,7 ± 1034	4896,4 ± 782,4	0,22
M3	286,1 ± 733,2	2657,7 ± 546,7	<b>*0,02</b>	3648,7 ± 718,7	3425 ± 662,4	0,9

Tabelle 14. Verlauf der sCalprotectin Konzentration innerhalb der Konversionsgruppe B1 und B2.

Messzeitpunkt	B1		B2	
	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)
<b>BL</b>	4964,6 (985,8 – 9573,7)	-	1795,3 (480,7 – 8371,1)	-
<b>M3</b>	5171,7 (1237,3 – 9467,3)	0,72	3095,5 (879,2 – 7683,4)	0,77

### 3.1.2 Effekte auf die weiteren klinischen Parameter der Nierenfunktion: GFR, Proteinurie

Zunächst wurde die GFR als Surrogatparameter neben den Biomarkern zur Beurteilung der Nierenfunktion nach Konversion der Immunsuppression auf Belatacept gegenüber den Standardimmunsuppressiva CNI und mTORi bestimmt.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum war eine positive Entwicklung des GFR-Werts (Abb. A) nach Konversion des CNI-basierten Therapieregimes auf Belatacept (Gruppe B1) mit einer signifikanten Zunahme der GFR nach sechs ( $p = 0,01$ ) und neun ( $p = 0,01$ ) Monaten zu erkennen.

Dahingegen zeichneten sich die GFR-Werte der Kontrollpatienten unter CNI-Therapie nur durch geringe Schwankungen aus.

Betrachtet man die Mittelwerte und statistischen Signifikanzen zwischen den beiden Gruppen (B1 und K1), konnte im Studienverlauf kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden.

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen B2 und K2 hinsichtlich der GFR (Abb. B) setzten sich bis zu neun Monate nach Studienbeginn fort (BL:  $p = 0,01$ , M3:  $p = 0,01$ , M6:  $p = 0,01$ , M9:  $0,01$ ).

Die Konversion von mTORi auf Belatacept (Gruppe B2) sowie die Therapie unter Standardimmunsuppression unter mTORi (Gruppe K2) zeigte über den Beobachtungszeitraum von neun Monaten innerhalb der Gruppen keine statistischen Unterschiede auf (siehe Tabellen 15 und 16).

## GFR

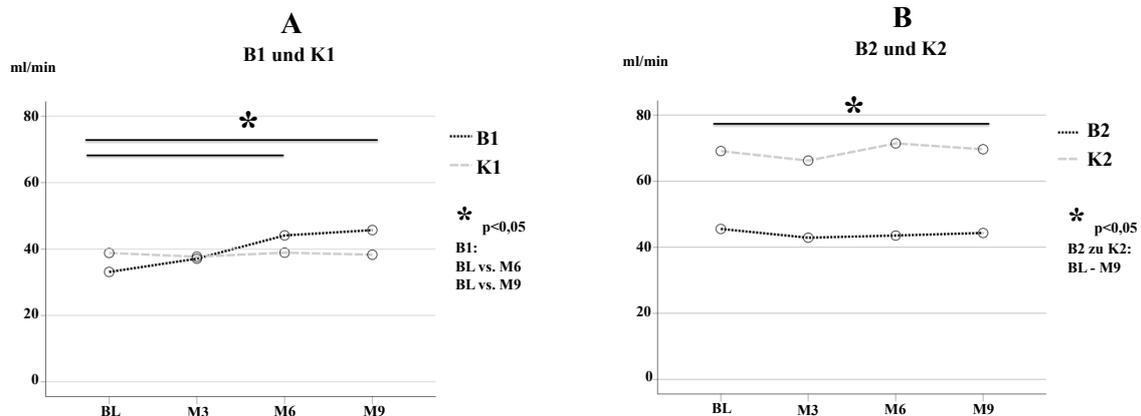


Abbildung 6. Mittelwerte der GFR in ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, Konversionsgruppe (B1 n = 10, B2 n = 9), stabile und gematchte Kontrollgruppe (K1 n = 10, K2 n = 9) über einen Beobachtungszeitraum von neun Monaten (M3 = Monat drei, M6= Monat sechs, M9 = Monat neun) nach BL (Baseline), A: B1 vs. K1 und B: B2 vs. K2, \*p ≤ 0,05 zeigt den statistisch signifikanten Unterschied durch den Mann-Whitney-U-Test und den Wilcoxon-Test an.

Tabelle 15. GFR der Konversionsgruppen B1 und B2 und deren Kontrollgruppen K1 und K2.

Messzeitpunkt	B1	K1	p-Wert	B2	K2	p-Wert
	MW ± SD			MW ± SD		
<b>BL</b>	33,1 ± 5,4	38,8 ± 3	0,17	45,6 ± 6,2	69,1 ± 4,6	<b>*0,01</b>
<b>M3</b>	37,1 ± 6,1	37,7 ± 3,5	0,53	42,9 ± 6,8	66,2 ± 3,7	<b>*0,01</b>
<b>M6</b>	44,1 ± 8,1	38,9 ± 3,7	0,91	43,6 ± 7,3	71,4 ± 5,2	<b>*0,01</b>
<b>M9</b>	45,7 ± 9,4	38,3 ± 4,6	0,85	44,3 ± 7,5	69,7 ± 4	<b>*0,01</b>

Tabelle 16. GFR der Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf.

Messzeitpunkt	B1		B2	
	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)
<b>BL</b>	26,5 (15 - 63)	-	43 (28 - 85)	-
<b>M3</b>	31,5 (15 - 73)	0,21	36 (23 - 90)	0,41
<b>M6</b>	32 (16 - 94)	<b>*0,01</b>	38 (17 - 90)	0,48
<b>M9</b>	33 (16 - 105)	<b>*0,01</b>	34 (20 - 90)	0,58

### Proteinurie

Als weiterer Surrogatparameter wurde die Proteinurie mit einem ebenfalls hohen prädiktiven Wert zur Beurteilung der Nierenfunktion nach Umstellung auf Belatacept in den Konversionsgruppen B1 und B2 in Gegenüberstellung zu deren Kontrollgruppen K1 und K2 bestimmt.

Innerhalb der Konversionsgruppe B1 war nach Therapieumstellung auf Belatacept eine deutliche Zunahme der Proteinurie nach sechs Monaten zu verzeichnen ( $p = 0,01$ ). Auch bei der darauffolgenden Visite war der Anstieg nach neun Monaten noch signifikant ( $p = 0,04$ ). Für die weiteren Werte innerhalb der Gruppe K1 und den Vergleich der beiden Gruppen B1 und K1 können die Tabellen und Grafiken herangezogen werden.

Der Vergleich zwischen den von mTORi auf Belatacept konvertierten Patienten der Konversionsgruppe B2 (Abb. B) sowie deren Kontrollpatienten zeigte zu Studienbeginn und drei Monate danach signifikant höhere Proteinurie in Gruppe B2 (BL:  $p = 0,04$ , M3:  $p = 0,02$ ).

Der weitere Verlauf der Proteinurie kann den Tabellen (Tab. 17 und 18) und der Abbildung (Abb. 7) entnommen werden.

## Proteinurie - Albumin/-Kreatinin-Ratio

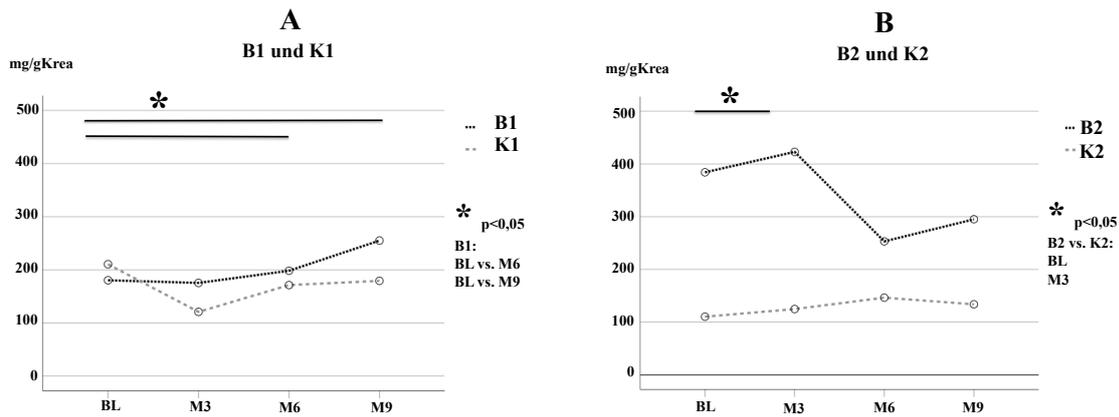


Abbildung 7. Mittelwerte der Proteinurie in mg/l, Konversionsgruppe (B1 n = 10 (n = 9 zu M3), B2 n = 9), stabile und gematchte Kontrollgruppe (K1 n = 10, K2 n = 9) über einen Beobachtungszeitraum von neun Monaten nach BL, A: B1 vs. K1 und B: B2 vs. K2.

Tabelle 17. Albumin-Kreatinin Quotient der Konversionsgruppen B1 und B2 und der Kontrollgruppen K1 und K2 im Verlauf.

Messzeitpunkt	B1	K1	p-Wert	B2	K2	p-Wert
	MW ± SD			MW ± SD		
<b>BL</b>	180,3 ± 175,7	210,4 ± 213,1	0,99	384,2 ± 434,7	110,3 ± 77,5	<b>*0,04</b>
<b>M3</b>	175,3 ± 170,1	120,8 ± 60,2	0,53	423 ± 375,1	124,8 ± 72,1	<b>*0,02</b>
<b>M6</b>	198,2 ± 183,9	171,2 ± 153,3	0,48	253,2 ± 223,3	146,4 ± 90,3	0,3
<b>M9</b>	255 ± 224,7	179,2 ± 185	0,25	295,1 ± 203,4	133,8 ± 80,8	0,06

p-Wert durch MWU (Mann-Whitney-U-Test) bestimmt.

Tabelle 18: Albumin-Kreatinin Quotient von Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf.

Messzeitpunkt	B1		B2	
	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)
<b>BL</b>	137 (54 - 655)	-	245 (68 - 1449)	-
<b>M3</b>	133,5 (69 - 649)	0,51	346 (71 - 1142)	0,44
<b>M6</b>	139 (63 - 692)	<b>*0,01</b>	151 (67 - 761)	0,26
<b>M9</b>	187 (87 - 778)	<b>*0,04</b>	315 (77 - 672)	0,86

### 3.1.3 Auswirkung der Immunsuppression auf die Sekretion der Zytokine

Der Einfluss der Ko-Stimulationsblockade, des mTORi und des CNI, auf die 23 Zytokine aus dem Multiplex-Versuch wird nachfolgend beschrieben.

Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von neun Monaten wiesen die vier Chemokine CCL1, CCL8, CCL15 und CXCL12 nach Konversion auf Belatacept Veränderung der Konzentration auf. Daher wurden diese vier Chemokine von den insgesamt 23 gemessenen Zytokinen aus dem Multiplex-Versuch im Rahmen der statistischen Auswertung näher betrachtet.

#### CCL1

Drei Monate nach Studieneinschluss war der Unterschied der zu Belatacept konvertierten Patienten gegenüber den Kontrollpatienten der Gruppe K1 (Abb. A) bereits signifikant höher ( $p = 0,03$ ). Auch innerhalb der Gruppe B1 kam es drei Monate nach Konversion auf Belatacept zu einem kontinuierlichen, signifikanten Anstieg der CCL1-Konzentration im Plasma, der auch sechs Monate nach Baseline weiterhin signifikant war (M3:  $p = 0,01$ , M6:  $p = 0,01$ ). Im weiteren Verlauf zeigte die Konversionsgruppe B1 ebenso signifikant höhere Werte des Chemokins CCL1 im Vergleich zur Kontrollgruppe K1. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nach neun Monaten signifikant (M6:  $p = 0,02$ , M9:  $p = 0,02$ ).

Die CCL1-Sekretion im Plasma der Kontrollpatienten verhielt sich unter CNI-basierter Immunsuppression über den gesamten Beobachtungszeitraum von neun Monaten stabil.

Beobachteten wir die CCL1-Konzentration in der Konversionsgruppe B2 im Vergleich zu deren Kontrollpatienten (Kontrollgruppe K2), war die CCL1-Konzentration nach drei Monaten ( $p = 0,04$ ) und weiteren drei Monaten signifikant höher als in der Kontrollgruppe K2 ( $p = 0,01$ ). Die Therapiefortsetzung unter mTORi hatte keinen Effekt auf die CCL1-Werte in der Kontrollgruppe K2.

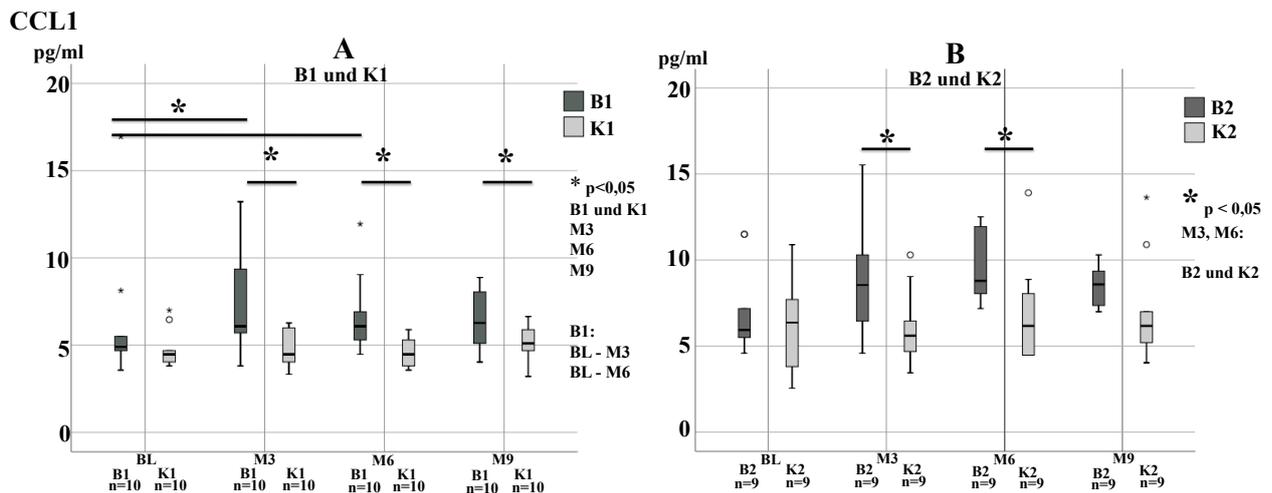


Abbildung 8. CCL1 Konzentration in pg/ml, Konversionsgruppe (B1 n = 10, B2 n = 9), stabile und gematchte Kontrollgruppe (K1 n = 10, K2 n = 9) über einen Beobachtungszeitraum von 9 Monaten nach BL, M3, M6, M9, A: B1 vs. K1 und B: B2 vs. K2, \* $p \leq 0,05$  zeigt den statistisch signifikanten Unterschied durch den Mann-Whitney-U-Test an.

Tabelle 19. CCL1-Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und der Kontrollgruppen K1 und K2.

Messzeitpunkt	B1	K1	p-Wert	B2	K2	p-Wert
	MW ± SD			MW ± SD		
BL	7 ± 2,5	6,1 ± 2,5	0,62	6,4 ± 4,1	4,8 ± 1,1	0,22
M3	8,8 ± 3,2	6,1 ± 2,1	<b>*0,04</b>	7,5 ± 3,1	4,7 ± 1,1	<b>*0,04</b>
M6	9,5 ± 2	6,9 ± 2,9	<b>*0,02</b>	6,8 ± 2,4	4,5 ± 0,9	<b>*0,01</b>
M9	8,5 ± 1,1	7 ± 3	<b>*0,02</b>	6,5 ± 1,8	5 ± 1,1	<b>0,01</b>

Tabelle 20. CCL1-Konzentration von Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf.

Messzeitpunkt	B1		B2	
	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)	Median (IQA)	p p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)
<b>BL</b>	5,9 (4,6 – 11,5)	-	4,9 (3,6 - 17)	-
<b>M3</b>	8,6 (4,6 – 15,5)	<b>*0,04</b>	6,1 (3,8 – 13,2)	0,11
<b>M6</b>	8,8 (7,2 – 12,5)	<b>*0,01</b>	6,1 (4,5 – 11,9)	0,11
<b>M9</b>	8,6 (7 – 10,3)	0,07	6,3 (4-8,9)	0,31

## CCL8

In den folgenden Grafiken wird die Sekretion von CCL8 näher untersucht.

Auffällig war die signifikante Zunahme der CCL8-Konzentration (Abb. A) in den von CNI zu Belatacept konvertierten Patienten sechs Monate nach Studieneinschluss (B1;  $p = 0,01$ ).

Zu diesem Zeitpunkt unterschied sich die CCL8-Konzentration ebenfalls signifikant von den Kontrollpatienten unter CNI-Therapie ( $p = 0,03$ ).

In der Kontrollgruppe K1 war hingegen keine wesentliche Veränderung der CCL8-Konzentration festzustellen.

Betrachtete man die CCL8-Konzentration in den von mTORi zu Belatacept konvertierten Patienten, wurde eine signifikante Zunahme des Chemokins CCL8 bereits nach drei Monaten deutlich ( $p = 0,01$ ). Auch neun Monate nach Umstellung war der Anstieg des CCL8 in der Konversionsgruppe B2 stets signifikant ( $p = 0,02$ ). In der Kontrollgruppe K2 blieb CCL8 über den gesamten Beobachtungszeitraum auf einem konstanten Nachweisniveau.

Die Gegenüberstellung der beiden Gruppen (B2 und K2) wies signifikant höhere CCL8-Konzentrationen in der Konversionsgruppe B2 drei sowie sechs Monate nach Studieneinschluss auf (M3:  $p = 0,01$ , M6:  $p = 0,01$ ).

## CCL8

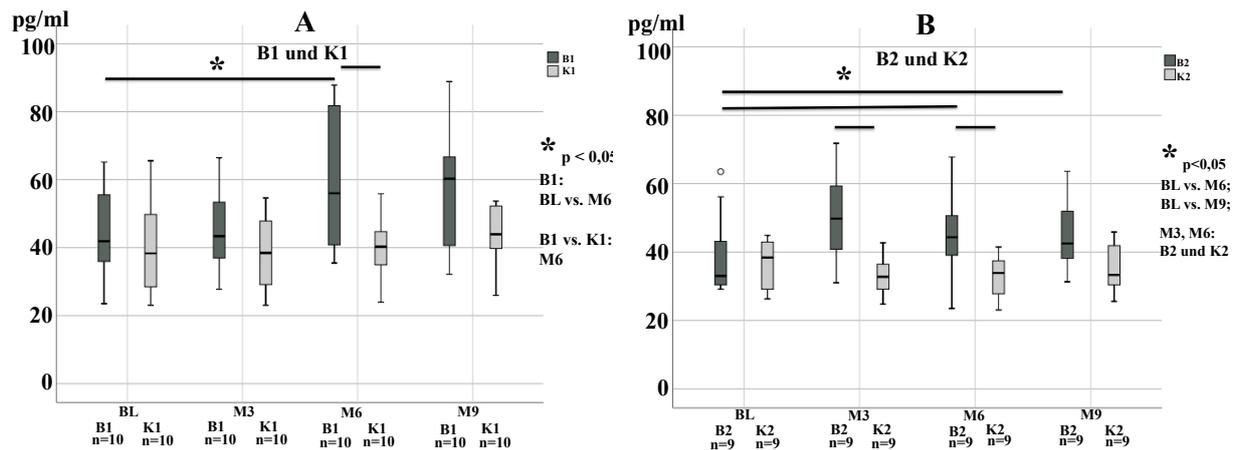


Abbildung 9. CCL8 in pg/ml, Konversionsgruppe (B1 n = 10, B2 n = 9), stabile und gematchte Kontrollgruppe (K1 n = 10, K2 n = 9) über einen Beobachtungszeitraum von 9 Monaten nach BL, M3, M6, M9, A: B1 vs. K1 und B: B2 vs. K2, \* $p \leq 0,05$  zeigt den statistisch signifikanten Unterschied durch den Mann-Whitney-U-Test an.

Tabelle 21. CCL8-Konzentration in Konversionsgruppen B1 und B2 und deren Kontrollgruppen K1 und K2.

Messzeitpunkt	B1	K1	p-Wert	B2	K2	p-Wert
	MW $\pm$ SD			MW $\pm$ SD		
BL	44,2 $\pm$ 13,3	40,2 $\pm$ 13,4	0,48	39 $\pm$ 12,7	36,2 $\pm$ 8	0,66
M3	44,7 $\pm$ 12,1	38,8 $\pm$ 11,1	0,31	50,2 $\pm$ 14,4	33 $\pm$ 5,6	<b>*0,01</b>
M6	59,1 $\pm$ 19,9	40 $\pm$ 9	<b>*0,03</b>	46,3 $\pm$ 13,7	32,3 $\pm$ 6,9	<b>*0,01</b>
M9	58,9 $\pm$ 19,6	43,5 $\pm$ 8,6	0,09	44,6 $\pm$ 10,2	35 $\pm$ 7,6	0,06

p-Wert durch MWU (Mann-Whitney-U-Test) bestimmt.

Tabelle 22. CCL8-Konzentration von Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf.

Messzeitpunkt	B1		B2	
	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)
<b>BL</b>	41,9 (23,5 – 65,2)	-	33,1 (29,1 – 63,5)	-
<b>M3</b>	43,4 (27,8 – 66,5)	0,96	49,8 (31 – 71,8)	0,44
<b>M6</b>	56 (35,5 – 87,9)	<b>*0,01</b>	44,3 (23,5 – 67,8)	<b>*0,01</b>
<b>M9</b>	60,3 (32,3 – 88,9)	0,07	42,4 (31,3 – 63,7)	<b>*0,02</b>

## CCL15

Die zum Studieneinschluss noch mit CNI behandelten Patienten (Konversionsgruppe B1) zeigten vor Konversion zu Belatacept im Vergleich zu ihren Kontrollpatienten (Kontrollgruppe K1) signifikante Unterschiede ( $p = 0,04$ ) hinsichtlich der CCL15-Konzentration (Abb. A). Im weiteren Studienverlauf näherten sich die beiden Gruppen einander an und wiesen schließlich keine Unterschiede mehr auf. Die Konversion von CNI auf Belatacept (Konversionsgruppe B1) führte neun Monate nach Studienbeginn zu einem statistisch signifikanten Anstieg der CCL15-Konzentration ( $p = 0,01$ ). Im Gegensatz dazu hatte die Therapie unter CNI in der Kontrollgruppe K1 keinen Einfluss auf die Konzentration des CCL15.

Die von mTORi auf Belatacept konvertierten Patienten zeigten einen Anstieg der CCL15-Sekretion, der drei Monate nach Studieneinschluss statistisch signifikant war ( $p = 0,01$ ). Zu diesem Zeitpunkt war die CCL15-Konzentration in der Konversionsgruppe B2 signifikant höher als in der Kontrollgruppe K2 ( $p = 0,02$ ).

Die Kontrollpatienten wiesen über den gesamten Beobachtungszeitraum eine konstante CCL15-Konzentration auf (siehe Tabellen und Abbildung B).

## CCL15

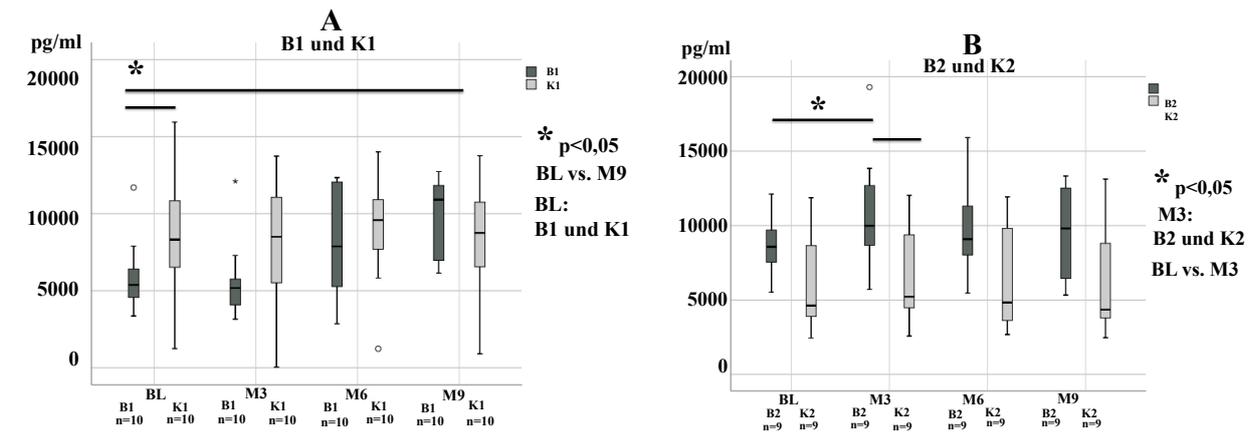


Abbildung 10. CCL15 in pg/ml, Konversionsgruppe (B1 n = 10, B2 n = 9), stabile und gematchte Kontrollgruppe (K1 n = 10, K2 n = 9) über einen Beobachtungszeitraum von 9 Monaten nach BL, M3, M6, M9, A: B1 vs. K1 und B: B2 vs. K2, \*p ≤ 0,05 zeigt den statistisch signifikanten Unterschied durch den Mann-Whitney-U-Test an.

Tabelle 23. CCL15-Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und deren Kontrollgruppen K1 und K2 im Verlauf.

Messzeitpunkt	B1	K1	p-Wert	B2	K2	p-Wert
	MW ± SD			MW ± SD		
<b>BL</b>	5915,3 ± 2388,6	8893,1 ± 4206,2	<b>*0,04</b>	8689,3 ± 2101,8	6074 ± 3444,5	0,09
<b>M3</b>	5645,3 ± 2581,1	7677,6 ± 4411,7	0,17	10780,4 ± 4157,3	6352,1 ± 3297,4	<b>*0,02</b>
<b>M6</b>	8109,6 ± 3909,9	8842,1 ± 3476,9	0,85	9690,9 ± 3429,7	6246,9 ± 3470,8	0,08
<b>M9</b>	10076,4 ± 2541,8	8294,9 ± 3626,2	0,19	9425,9 ± 3089,7	6330 ± 3756,4	0,06

p-Wert durch MWU (Mann-Whitney-U-Test) bestimmt.

Tabelle 24. CCL15-Konzentration von Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf.

Messzeitpunkt	B1		B2	
	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)
<b>BL</b>	5377,7 (3358 – 11695,8)	-	8572,5 (5517,5 – 12115,1)	-
<b>M3</b>	5175,7 (3154,9 – 12100,7)	0,09	9985,6 (5710,6 – 19303,3)	<b>*0,01</b>
<b>M6</b>	7870,1 (2853,5 - 12336)	0,07	9084,2 (5466,4 – 15907,3)	0,34
<b>M9</b>	10901 (6142 – 12728,4)	<b>*0,01</b>	9808,5 (5327,4 – 13329,3)	0,37

## CXCL12

Die Konversion von CNI auf Belatacept (B1 Konversionsgruppe) führte neun Monate nach Studieneinschluss zu einem signifikanten Anstieg ( $p = 0,04$ ) der CXCL12-Konzentration (Abbildung A).

Innerhalb der Kontrollgruppe K1 blieb die Konzentration des CXCL12 nahezu konstant.

Betrachtete man die beiden Gruppen B1 und K1, unterschieden sie sich nicht wesentlich hinsichtlich ihrer CXCL12-Konzentration.

Drei Monate nach Konversion von mTORi auf Belatacept kam es innerhalb der Konversionsgruppe B2 zum signifikanten Anstieg ( $p = 0,02$ ) des CXCL12 (Abbildung B).

Der Vergleich der Konversionsgruppe B2 mit der Kontrollgruppe K2 wies über den gesamten Beobachtungszeitraum auf keine Unterschiede mit statistischer Relevanz hin. Den angeführten Tabellen (Tab. 25 und 26) und der Abbildung (Abb. 11) können die weiteren Werte entnommen werden.

## CXCL12

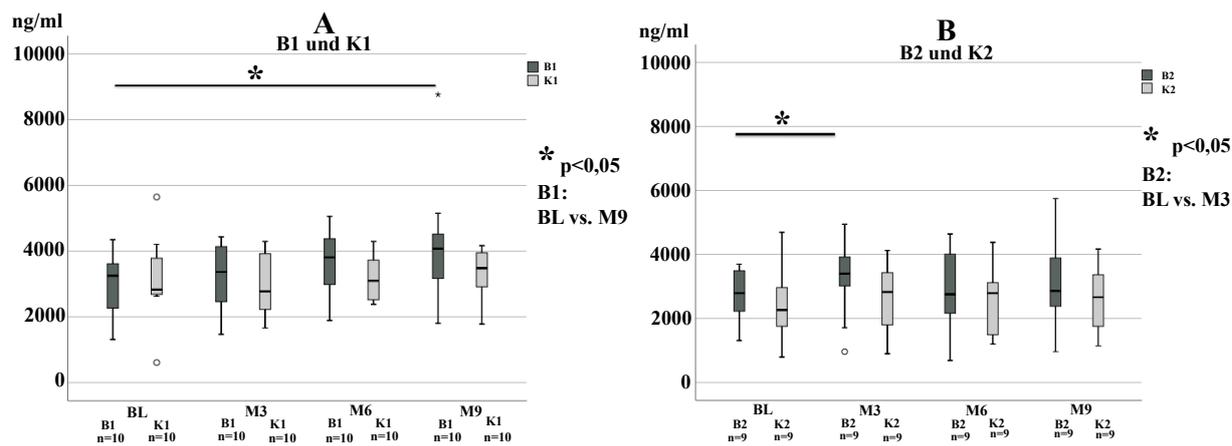


Abbildung 11. CXCL12 in pg/ml, Konversionsgruppe (B1 n = 10, B2 n = 9), stabile und gematchte Kontrollgruppe (K1 n = 10, K2 n = 9) über einen Beobachtungszeitraum von 9 Monaten nach BL, M3, M6, M9, A: B1 vs. K1 und B: B2 vs. K2, \* $p \leq 0,05$  zeigt den statistisch signifikanten Unterschied durch den Mann-Whitney-U-Test und Wilcoxon-Test an.

Tabelle 25. CXCL12-Konzentration der Konversionsgruppen B1 und B2 und deren Kontrollgruppen K1 und K2 im Verlauf.

Messzeitpunkt	B1	K1	p-Wert	B2	K2	p-Wert
	MW ± SD			MW ± SD		
BL	3021,2 ± 926,1	3139,2 ± 1301,5	0,971	2766,4 ± 887,1	2528,1 ± 1173,4	0,666
M3	3196,5 ± 1034	2944,2 ± 900,7	0,971	3218,7 ± 1232,9	2669,1 ± 1131,7	0,863
M6	3651,8 ± 1038,3	3206,8 ± 727	0,579	2884,3 ± 1217	2579,6 ± 1168,7	0,730
M9	4180,4 ± 1920,3	3370,4 ± 723,6	0,393	3089,4 ± 1437	2640,4 ± 1093,7	0,340

Tabelle 26. CXCL12-Konzentration von Konversionsgruppe B1 und B2 im Verlauf.

Messzeitpunkt	B1		B2	
	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)	Median (IQA)	p-Wert BL zu M (Wilcoxon – Test)
BL	3250,5 (1312 – 4349,9)	-	2791,7 (1312 - 3693,8)	-
M3	3365 (1467,9 – 4433,3)	0,51	3397,1 (964 - 4943)	*0,02
M6	3810,2 (1890,2 – 5059,5)	0,07	2756 (687,7 – 4638,1)	0,59
M9	4072,6 (1801,1 – 8763,2)	*0,04	2862,3 (964 – 5742,6)	0,44

In 19 von insgesamt 23 Zytokinen ergab die Untersuchung keine Veränderungen hinsichtlich der Konzentration nach Umstellung der Therapie auf Belatacept in den beiden Konversionsgruppen B1 und B2.

Tabelle 27. Konzentrationen der weiteren 19 Zytokine aus dem Multiplex-Versuch in der Konversionsgruppe B1.

Messzeitpunkt	BL	M3	M6	M9	P-Wert
	<b>Median (IQA)</b>				
<b>CCL24</b>	2378,1 (488,4-9475,2)	1790,4 (745,7 – 7573,3)	2342,9 (824,2 – 8590,5)	1540,4 (559,8 – 6128,7)	<b>n.s.</b>
<b>CXCL13</b>	40 (19,5 – 318,4)	35,1 (15,6 – 212,8)	50,8 (22,4 – 534,9)	46,1 (32,3 – 361,7)	<b>n.s.</b>
<b>CCL13</b>	95,8 (85,7 – 176,5)	100,6 (62,7 – 186,7)	141,5 (68,9 – 203)	131,6 (95,8 – 288,6)	<b>n.s.</b>
<b>IL-16</b>	90,2 (34,3 – 237,5)	82,1 (38,7 – 120,5)	90,5 (56,3 – 1133,5)	99,8 (43,8 – 639,4)	<b>n.s.</b>
<b>CCL17</b>	114,1 (21,6 – 292,7)	76,7 (21 – 271,5)	132,4 (29,5 – 343,5)	85,5 (18,4 – 384,7)	<b>n.s.</b>
<b>CCL21</b>	676,9 (204,7 – 1587,8)	537,7 (204,7 – 1755,9)	941,4 (569,9 – 7989,6)	1092 (678,3 – 6792)	<b>n.s.</b>
<b>CCL26</b>	12,6 (6,9 – 24,8)	12,6 (7,9 – 36)	25,2 (16,3 – 46,6)	27,2 (16,3 – 70,3)	<b>n.s.</b>
<b>LIF</b>	6,1 (0,3 – 71,2)	4,7 (0,1-76,4)	10,4 (5,6 – 16)	9,4 (4,9 – 33,1)	<b>n.s.</b>
<b>TPO</b>	179,4 (151,6 – 231,8)	158,8 (85 – 643,4)	144,4 (50,2 – 2082)	79,2 (14,4 – 1844,5)	<b>n.s.</b>
<b>SCF</b>	67,1 (24 – 132,6)	60,7 (29,1 – 142,5)	56,4 (30,8 – 178,2)	56,2 (25,7 – 186,8)	<b>n.s.</b>
<b>TSLP</b>	1,7 (0,9 – 8,6)	1,2 (0,7 – 14,4)	3,2 (0,9 – 19,5)	3,9 (1,9 – 97,1)	<b>n.s.</b>
<b>IL-33</b>	6,2 (0,1 – 29,3)	3,4 (1,3 – 67,4)	11,2 (3 – 232,1)	10,6 (6,2 – 234,8)	<b>n.s.</b>
<b>IL-20</b>	184,7 (117,5 – 265,9)	161,3 (117,5 – 290)	277,5 (169,4 – 1331,6)	284,1 (220,6 – 1268,3)	<b>n.s.</b>
<b>IL-21</b>	3,6 (2,3 – 13,6)	3,7 (2,3 – 15,9)	7 (3,7 – 18,3)	8,1 (5,6 – 32,7)	<b>n.s.</b>
<b>IL-23</b>	76,7 (31,4 – 449,2)	59,6 (42,7 – 1105,1)	180,1 (65,3 – 1231,7)	214,9 (145,5 – 3207,4)	<b>n.s.</b>
<b>TRAIL</b>	52,8 (15,9 – 111,2)	57,2 (12 – 177,9)	56,4 (0,1-162,5)	56,8 (14,8 – 153,6)	<b>n.s.</b>
<b>CTACK</b>	1694,1 (823,8 – 2409,1)	1315,3 (909,1 – 2058,8)	1643,1 (1065 – 2001,9)	1779,8 (1301,7 – 2498,1)	<b>n.s.</b>
<b>ENA-78</b>	1065,4 (880,8 – 2031,5)	1110,9 (275,5 – 3555,5)	1099 (673,4 – 3328)	649,9 (441,9 – 1781,5)	<b>n.s.</b>
<b>IL-28A</b>	30,9 (6,1 – 90,8)	32,4 (0,1 – 139,4)	64 (36,9 – 233,2)	86,1 (50,9 – 1650,2)	<b>n.s.</b>

Median der Zytokinkonzentrationen im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von neun Monaten; statistisch signifikanter Unterschied durch den Wilcoxon – Test berechnet; LIF (Leukemia inhibitory factor); TPO (Thrombopoetin); SCF (Stem cell factor); TSLP (Thymic stromal lymphopoietin); IL (Interleukin); TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand); CTACK (Cutaneous T-Cell Attracting Chemokine); ENA-78 (Epithelial neutrophil-activating protein 78).

Tabelle 28. Konzentrationen der weiteren 19 Zytokine aus dem Multiplex-Versuch in der Konversionsgruppe B2.

Messzeitpunkt	BL	M3	M6	M9	p-Wert
Median (IQA)					
<b>CCL24</b>	921,4 (128,3 – 2188,3)	1002,4 (344,6 – 3379,3)	1029,2 (277,1 – 3375,8)	912,7 (432,7 – 3360,1)	<b>n.s.</b>
<b>CXCL13</b>	40,5 (8,3 – 91,8)	38,7 (20,1 – 210,7)	40,3 (11,7 – 147,3)	22,6 (8,7 – 713,8)	<b>n.s.</b>
<b>CCL13</b>	110 (74,7 – 190)	139,6 (62,7 – 183,3)	114,5 (49,2 – 203)	114,5 (49,2 – 199,8)	<b>n.s.</b>
<b>IL-16</b>	60,7 (40,4 – 91,1)	66,4 (45,4 – 104,2)	56,3 (51 – 123,2)	77,9 (45,4 – 96,6)	<b>n.s.</b>
<b>CCL17</b>	43,4 (20,7 – 183)	59,1 (20,2 – 123,7)	60,5 (7,9 – 124,8)	56,4 (23,3 – 104,6)	<b>n.s.</b>
<b>CCL21</b>	1015 (569,9 – 1832,5)	1256,8 (632,6 – 1875,8)	975,1 (569,9 – 2403,2)	921,2 (663,2 – 2511,8)	<b>n.s.</b>
<b>CCL26</b>	24,8 (14,5 – 40,6)	28,1 (12,6 – 44,4)	24,8 (14,5 – 52,5)	21,4 (12,6 – 42,1)	<b>n.s.</b>
<b>LIF</b>	6,6 (4,2 -45,4)	8,3 (1,6 – 30,2)	6,3 (2,9 – 73,8)	4,6 (0,3 – 46,1)	<b>n.s.</b>
<b>TPO</b>	68,7 (14,4 – 256,4)	43,4 (18,7 – 149,2)	52,5 (10,1 – 154)	36,6 (10,1 – 144,4)	<b>n.s.</b>
<b>SCF</b>	39,5 (15,7 – 54,6)	35 (13,5 – 54,2)	37,9 (13,5 – 62,7)	36,6 (10,8 – 68,2)	<b>n.s.</b>
<b>TSLP</b>	2,7 (1,6 – 3,8)	2,9 (1,2 – 5,1)	2,6 (1,4 -6,3)	2,3 (1,4 – 6,3)	<b>n.s.</b>
<b>IL-33</b>	7,8 (4,6 – 29,3)	8,6 (2,2 – 17,9)	9,4 (3,8 – 20,2)	5,8 (3,8 – 20,2)	<b>n.s.</b>
<b>IL-20</b>	227,4 (169,4 – 346)	240,6 (169,4 – 278,1)	220,6 (192,2 – 377,3)	213,7 (136 – 377,3)	<b>n.s.</b>
<b>IL-21</b>	7,5 (2,3 – 20,6)	7,5 (3,7 – 26,4)	6,2 (4,3 – 38,7)	6,2 (3 – 31,2)	<b>n.s.</b>
<b>IL-23</b>	185,9 (99,5 – 284,8)	191,7 (76,7 – 355,1)	180,1 (88,1 – 390,3)	122,5 (88,1 – 355,1)	<b>n.s.</b>
<b>TRAIL</b>	37,1 (19,6 – 75,2)	37,8 (17,7 – 81,5)	46,9 (30,8 – 91,3)	43,8 (19,4 – 77,2)	<b>n.s.</b>
<b>CTACK</b>	1518,8 (708,3 – 2732,3)	1465,1 (726,7 – 2311,2)	1587,1 (696,8 – 2088,7)	1472,2 (732,2 – 2263,4)	<b>n.s.</b>
<b>ENA-78</b>	554,5 (136,6 – 1514,9)	762,8 (194,9 – 2402,6)	724,8 (87,5 – 1607,4)	526,5 (296,4 – 1518,71)	<b>n.s.</b>
<b>IL-28A</b>	53,6 (21,3 – 109,1)	56,3 (30,9 – 109,1)	39,8 (27,8 – 147,7)	53,6 (10,4 – 120,1)	<b>n.s.</b>

p-Wert mittels Wilcoxon – Test berechnet; Median der Zytokinkonzentrationen im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von neun Monaten

## **4 Diskussion**

Die hier erfolgte Studie beschäftigte sich mit dem Einfluss einer Ko-Stimulationsblockade auf Marker einer Nierenschädigung. Weiters wurde die Immunantwort mithilfe von Zytokin- und Chemokinprofilen bei Patienten nach Nierentransplantation im Vergleich zu einer Standardimmunsuppression mit CNI oder mTORi untersucht.

### **4.1 Charakterisierung der Immunantwort anhand der Zytokine nach Konversion auf Belatacept im Vergleich zur konventionellen Immunsuppression**

Bisher gibt es wenig Studien, die das Zytokinprofil zwischen unterschiedlichen immunsuppressiven Therapieregimen vergleichen.

#### **Die Sekretion der Chemokine nach Konversion auf Belatacept**

In der vorliegenden Studie nahmen die Konzentrationen der proinflammatorischen, Th2-assoziierten Chemokine CCL1, CCL8, CCL15 und CXCL12 im Plasma nach Konversion von den Standardimmunsuppressiva CNI oder mTORi auf Belatacept zu. Hervorzuheben ist hierbei die Tatsache, dass CCL15 und CXCL12 bereits drei Monate nach Studieneinschluss signifikant zunahmten. Die weiteren 19 Zytokine zeigten nach Konversion auf Belatacept über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Veränderung der Zytokinkonzentration.

Bislang sind diese Ergebnisse bei nierentransplantierten Patienten unter Therapie mit einer Ko-Stimulationsblockade erstmalig durch diese Arbeit vorliegend.

Lediglich im Tiermodell wurde der Effekt der Ko-Stimulationsblockade auf Th2-Zellen von Sayegh et al. untersucht. Dabei wurde der Einfluss des CTLA4-Ig auf die Alloimmunität und die Zytokinproduktion an nierentransplantierten Ratten in vivo bestimmt. Die Zytokine der Th2-Zellen waren im immunhistologischen Nachweis nach der CTLA4-Ig-Injektion unverändert, während in den Kontrollen ohne CTLA4-Ig-Behandlung spezifische Zytokine der Th1-Zellen häufiger detektiert wurden. Das CTLA4-Ig konnte somit die Zytokine der Th1-Zellen hemmen und gleichzeitig blieb die Zytokinproduktion von Th2-Zellen unverändert<sup>64</sup>. Diese Ergebnisse lassen sich auch auf diese Studie übertragen. Die Ko-Stimulationsblockade durch Belatacept könnte die Hemmung der Th2-Zellen-spezifischen Chemokine aufgehoben haben und führte laut den vorliegenden Daten zu deren Zunahme.

Um den Einfluss der Ko-Stimulation auf die Differenzierung zu Th2-Zellen genauer darzustellen, können die Studienergebnisse von Schweitzer et al. herangezogen werden<sup>65</sup>. Die naiven T-Zellen wiesen eine Abhängigkeit zu B7-Molekülen (CD80/86) auf, um IL-4 zu produzieren und sich zu Th2-Zellen differenzieren zu können. Die Bindung des CD28 auf den T-Zellen an das CD80/86 auf APC führt zur Ko-Stimulation von T-Zellen, u. a. auch T-Helferzellen wie die Th2-Zellen. In bereits aktivierten T-Zellen war die Zytokinproduktion von IL-4 und auch die Differenzierung der Th2-Zellen unabhängig von den B7-Molekülen (CD80/86). Übertragen auf die vorliegende Studie sollte die Ko-Stimulationsblockade unter Belatacept keinen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von aktivierten Th2-Zellen ausüben.

Das Chemokinprofil der Konversionsgruppen deutete auf proinflammatorische Prozesse und einen möglichen Shift zugunsten der Th2-Zellen hin.

Jedoch können Th2-Zellen auch an Rejektionen beteiligt sein und sollten hinsichtlich ihrer Funktion differenziert betrachtet werden<sup>66</sup>. Da unter der Belatacept-Therapie im Vergleich zu mTORi oder CNI häufiger Rejektionen auftreten, könnte das proinflammatorische Chemokinprofil in zumindest ein Hinweis für eine subklinische Rejektion sein. Die Rezeptoren CCR1 und CCR3 des CCL15 sowie die Rezeptoren der weiteren Chemokine befinden sich vorrangig auf antigenpräsentierenden Zellen (APC). Dies könnte auf Interaktionen zwischen APC und T-Zellen und somit auf entzündliche Prozesse in der Transplantatniere hindeuten<sup>67</sup>. Da es im Beobachtungszeitraum aber weder zur Verschlechterung der Nierenfunktion noch zu Abstoßungen kam, liegt die Annahme nahe, dass Gegenregulationen stattgefunden haben könnten.

Eine weiteres Chemokin aus der eigenen Studie, das CXCL12, zeigte in anderen Studien eine Veränderung der Konzentration beim Auftreten einer AR. Zum Zeitpunkt einer Rejektion an Primaten war die CXCL12-Konzentration in Belatacept-resistenten Rejektionen im Transplantatgewebe um das 2,83-Fache höher als im Transplantatgewebe, das auf Belatacept sensibel reagierte<sup>68</sup>. Auch die eigenen Studienpatienten wiesen erhöhte CXCL12-Konzentrationen auf. Ob dies auf Belatacept-resistente T-Zellen zurückzuführen ist, sollte in weiteren Analysen untersucht werden.

Bislang fehlen Studien, die Aufschluss darüber geben, welches Chemokinprofil in NTx unter den unterschiedlichen Immunsuppressiva typisch ist.

Elmoselhi et al. führten Untersuchungen von Chemokinen in NTx-Patienten durch. Hier wurden im Plasma von 47 nierentransplantierten Patienten die Chemokinkonzentrationen sowohl vor als auch post NTx bestimmt. Dabei lagen bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion geringere Chemokinkonzentrationen vor. Die spezifischen Chemokine der Th2-Helferzellen waren indes – wie auch in unserer Studie – erhöht<sup>12</sup>.

Ob die Immunsuppression einen Einfluss auf die Chemokinkonzentration hatte, untersuchten Grimbert et al. Die mRNA-Expression von Transkriptionsfaktoren der T-Helferzellen in Nierenbiopsien unterschied sich nicht unter Medikation mit CNI oder Belatacept<sup>69</sup>. In unserer Studie lagen jedoch höhere Th2-spezifische Chemokinkonzentrationen unter Belatacept-Therapie vor. Der Anstieg der überwiegend Th2-assoziierten Chemokine unter Ko-Stimulationsblockaden deutete auf ein Chemokin-Milieu, dass die Chemotaxis der Th2-Zellen förderte. Durch die selektive Blockade der CD28 zu CD80/86-Interaktion in T-Zellen wirkte das Belatacept eher spezifischer und könnte so die Aktivierung von T-Zellen inhibieren. Die erhöhten Th2-assoziierten Chemokine ließen nicht auf eine komplette Blockade aller T-Zellen durch Belatacept schließen. Im Vergleich zu Belatacept sollte im Folgenden ebenfalls der Effekt der konventionellen Immunsuppressiva auf das Chemokinprofil betrachtet werden.

### **Chemokinprofil unter Standardimmunsuppression mit CNI und mTORi**

Im Gegensatz dazu hatte eine konventionelle Immunsuppression mit mTORi und CNI, wie sie in der Kontrollgruppe unverändert fortgeführt wurde, keinen Einfluss auf die Sekretion dieser proinflammatorischen Chemokine. Die Zunahme der Chemokine nach Absetzen des CNI und mTORi und Konversion auf Belatacept könnte ein Hinweis dafür sein.

Im Weiteren werden die beiden Kontrollgruppen und deren Zytokinmuster unter CNI- und mTORi-Therapie diskutiert.

Unter kontinuierlicher CNI-Therapie blieben die Chemokine stabil, da hier durch die Inhibition des Calcineurin auch der Transkriptionsfaktor NFAT gehemmt wird. Dieser fördert die Expression des Interleukin-2 (IL-2) in aktivierten T-Zellen. Die Aktivierung des TCR und die Ko-Stimulation über CD28 führen intrazellulär zum Calcium-Einstrom, wodurch die Serin-/Threonin-Phosphatase Calcineurin im Allgemeinen über Calmodulin aktiviert wird. Unter CNI (Cyclosporin oder Tacrolimus) wird das Calcineurin jedoch durch Bindung der CNI an Immophiline, Cyclosporin an Cyclophilin und Tacrolimus an FKBP12, gehemmt. Die Vermutung liegt nahe, dass durch die CNI und Blockierung des NFAT-Wegs eine unspezifische Hemmung der T-Zelllinien erfolgte. Dadurch könnte die Zytokinproduktion reduziert sein und allgemein zur wirksameren Immunsuppression und der Hemmung eines breiten Spektrums an Immunzellen führen<sup>70</sup>.

Auch die mTORi stellen potente Immunsuppressiva dar, die zur Inhibition der B- und T-Zell-Proliferation sowie deren Differenzierung führen. Die mTORi setzen erst nach Aktivierung der T-Zellen über TCR und der CD28-Ko-Stimulation ein, indem sie die späteren Signale über IL-2 und weitere Zytokine zur Proliferation und zum Wachstum hemmen. Dies führt zur Anergie der

T-Zellen. Sowohl hämatopoetische als auch nichthämatopoetische Zellen können durch mTORi in der Proliferation gehemmt werden. Die mTOR-Blockade führt allgemein zu weitreichenderen und unspezifischen Blockaden von Immunzellen, darunter auch Th2-Zellen.

Die konventionelle Immunsuppression mit kontinuierlicher mTORi hatte in der vorliegenden Studie keinen Effekt auf die Chemokinkonzentrationen und zeigte nach Absetzen des mTORi in den Konversionsgruppen einen Anstieg.

### **Fazit zum Chemokinprofil unter Belatacept und Standardimmunsuppression**

Die unterschiedlichen Chemokinkonzentrationen unter den jeweiligen Immunsuppressiva können möglicherweise auf unterschiedliche Wirkmechanismen zur Hemmung der T-Zellen zurückgeführt werden.

Eventuell hemmt Belatacept selektiv die Ko-Stimulation in naiven T-Zellen in einem frühen Differenzierungsstadium zu Effektorzellen, die abhängig von diesem Signalweg sind. Vermutlich sind bereits aktivierte antigenspezifische T-Zellen unabhängig vom CD28/B7-Signalweg<sup>71</sup>. Die selektive Blockade unter Belatacept nach Absetzen von CNI und mTORi könnte zu einer erhöhten Chemokinproduktion geführt haben. Dagegen könnte CNI unabhängig vom Differenzierungsstadium der T-Zellen über die Blockade des TCR-Signalwegs unspezifischer und umso potenter die T-Zellaktivierung hemmen, wodurch die Chemokinkonzentration abnimmt. Auch unter Fortsetzung der mTORi Therapie kam es zu niedrigeren Werten, da mTORi als Proliferationshemmer eventuell unspezifisch eine Hemmung der T-Zellproliferation und Differenzierung zu Effektorzellen bewirkt. Ein Hinweis dafür könnte die Zunahme der Chemokine nach Absetzen von CNI und mTORi sein.

## **4.2 Beurteilung der konventionellen Immunsuppression im Vergleich zu Belatacept in Hinblick auf die Biomarker NGAL- und Calprotectin und die Nierenfunktion**

### **Biomarker NGAL**

Zusätzlich wurde der Einfluss der unterschiedlichen Immunsuppressiva CNI, mTORi und Belatacept auf die Marker der Nierenschädigung bei unseren Studienpatienten untersucht, z. B. Plasma-NGAL (pNGAL) und Calprotectin.

Die Detektion des pNGAL zeigte in den mit Belatacept behandelten Patienten nach Konversion von mTORi eine signifikante Zunahme der Plasma-NGAL-Konzentration.

In der Studie von Imamura et al. an herztransplantierten Patienten eignete sich die pNGAL-Konzentration als Prädiktor für die beeinträchtigte Nierenfunktion nach Umstellung auf Everolimus von MMF und reduzierter Gabe von CNI. Dadurch ließ sich im Gegensatz zum Serum-Kreatinin eher auf tubuläre Schäden schließen<sup>72</sup>. Auch in weiteren Studien eignete sich das sNGAL sowie das NGAL im Urin (uNGAL) um eine CNI-assoziierte Nephropathie zu detektieren<sup>73</sup>. Warum NGAL in dieser Patientengruppe letztendlich steigt, kann aktuell nicht sicher beantwortet werden.

In der Konversionsgruppe unter Belatacept-Therapie und unter kontinuierlicher Standardimmunsuppression mit CNI in der Kontrollgruppe blieb die NGAL-Plasma-Konzentration unverändert. Da sich NGAL in bisherigen Studien als Marker für Evaluation der Nierenschädigung eignete, ist vermutlich in den Patienten unter Belatacept und kontinuierlicher CNI keine Nierenschädigung aufgetreten.

Der höhere Outcome der pNGAL-Konzentration nach Konversion von mTORi auf Belatacept könnte auf das suboptimale Matching der Studiengruppen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses hinsichtlich der Nierenfunktion zurückzuführen sein.

### **Biomarker Calprotectin**

Der potenzielle Biomarker Calprotectin konnte, neben den klassischen Laborparametern, bereits in einigen Studien zur Diagnostik der renalen Nierenschädigung herangezogen werden.

In unserer Studienkohorte lieferte die Bestimmung des Calprotectin innerhalb der ersten drei Monate nach Studieneinschluss keine Unterschiede hinsichtlich der konventionellen Therapie unter CNI oder mTORi und der Konversion auf Belatacept. In der Studie von Seibert et al. wurde das Calprotectin im Urin zur Diagnostik des akuten intrinsischen Nierenversagens an Patienten mit AKI untersucht und bestätigte die Funktion des Calprotectin als Marker für die Entzündungsaktivität der Niere. Nephrotoxische Medikamente waren hierbei ebenfalls in der Lage, zum intrinsischen Nierenversagen zu führen und damit kann angenommen werden, dass die Calprotectin-Serum-Konzentration als Parameter zur Beurteilung der Nephrotoxizität geeignet war. Jedoch ließ sich in Bezug auf die unterschiedlichen Therapieregime keine Veränderung der Calprotectin-Konzentration in den ersten drei Monaten unserer Studie feststellen.

Letztlich könnte ein Anstieg der Biomarker ähnlich den Akute-Phase-Proteinen nicht nur auf renale pathologische Prozesse zurückzuführen sein, sondern auch auf extrarenale proinflammatorische Prozesse und systemische Komorbiditäten oder nicht diagnostizierte pathologische Vorgänge. Da beide Biomarker in aktivierten neutrophilen Granulozyten und Makro-

phagen vorkommen, könnten sie als weniger spezifisch für die Diagnostik der Nierenschädigung eingeordnet werden<sup>54 55</sup>.

### **Proteinurie und Nierenfunktion**

Das Transplantat- und Patientenüberleben lag in unserer Studie nach neun Monaten – sowohl in den von CNI und mTORi auf Belatacept konvertierten Gruppen B1 und B2 als auch in den Kontrollgruppen K1 und K2 mit konventioneller Immunsuppression – bei 100 %. Die Proteinurie stellte einen entscheidenden klinischen Parameter für die Prädiktion des NTx-Langzeit-Outcome dar<sup>74</sup>.

In unserer Studie war der Gruppenunterschied zwischen der Konversionsgruppe B2 und der Kontrollgruppe K2 zum Baseline-Zeitpunkt auffällig. So war eine allgemein schlechtere Nierenfunktion in den auf Belatacept konvertierten Patienten anhand der Proteinurie und GFR ( $\Delta=273,89\pm 119,07$ ;  $\Delta=23,55\pm 1,64$ ) festzustellen (Tabelle 15 bis 18).

Dabei war der Unterschied hinsichtlich der Proteinurie nur in den ersten drei Monaten zwischen der Belatacept Therapie und mTORi Standardimmunsuppression signifikant, während sich die GFR-Werte länger (bis Monat neun nach Studieneinschluss) signifikant unterschieden.

Letztlich ist dies auf das suboptimale Matching der Kontroll- und Konversionspatienten beider mTORi-Gruppen (Gruppe B2 und K2) hinsichtlich der NTx-Funktion zum Baseline-Zeitpunkt zurückzuführen.

In der vorliegenden Studie deutete der Vergleich zwischen der Belatacept-Therapie und der Standardimmunsuppression unter CNI auf signifikant bessere GFR-Werte nach Umstellung von CNI auf Belatacept hin. Dies war bereits sechs Monate nach Studieneinschluss bis zum Ende der Studie ersichtlich.

Dagegen nahm die Proteinurie nach Umstellung von CNI auf Belatacept sechs Monate nach Studieneinschluss bis zum Ende der Studie signifikant zu, was auf die heterogenen Proteinuriewerte innerhalb der Konversionsgruppe B1 zurückzuführen ist und ihre allgemein instabile Nierenfunktion.

Bereits in der multizentrischen Phase-II-Studie von Rostaing et al. und in der retrospektiven Studie von Brakemeier et al. wurde die Konversion von CNI auf Belatacept in Hinblick auf die Immunsuppression für Patienten mit stabiler Transplantatfunktion als erfolgsversprechender beschrieben. Dies bestätigt sich auch anhand der Verbesserung der GFR in unserer Studie<sup>75 76</sup>.

Durch weitere Studien und der Evaluation der noninvasiven Biomarker NGAL und Calprotectin an NTx-Patienten sollte vor allem in der nephrologischen Betreuung die Entscheidung über wei-

tere diagnostische Tests, die Verabreichung nephrotoxischer Medikamente und Prozeduren und die Interaktion mit Spezialisten vereinfacht werden.

### **4.3 Limitationen der Studie**

Ziel der vorliegenden Studie war die Gegenüberstellung der unter Belatacept behandelten Konversionsgruppen und deren Kontrollpatienten unter CNI- und mTORi-Therapie anhand von Biomarkern der Nierenschädigung sowie inflammatorischen Chemokine. Dabei sollten folgende Hypothesen untersucht werden:

- Unter Belatacept-Therapie liegt eine verbesserte NTx-Funktion und damit verbunden eine geringere NTx-Schädigung vor.
- Das Chemokinprofil unterscheidet sich zwischen Standardimmunsuppression und Belatacept.

Anhand des prospektiven Studiendesigns wurde durch klinische Surrogatparameter, wie die GFR und Proteinurie, die Vergleichbarkeit zwischen den Studienkohorten über den vollständigen Beobachtungszeitraum von neun Monaten ermöglicht. Eine weitere Stärke unserer Studie lag in dem zeitlich definierten Anfangspunkt, dem Baseline-Zeitpunkt, ab dem der Einfluss der Immunsuppression auf die Biomarker, Nierenfunktion und Chemokin-Level bestimmt werden konnte.

Dennoch sollte die Betrachtung unserer monozentrischen, nichtrandomisierten, kontrollierten Interventionsstudie aufgrund des heterogenen Patientenkollektivs und der geringen Fallzahl nur explorativ erfolgen. Zwar wies pNGAL Signifikanzen zwischen den auf Belatacept konvertierten Patienten und den unter mTORi behandelten Kontrollpatienten auf, die jedoch eher auf das unzureichende Matching hinsichtlich der Nierenfunktion zurückzuführen sind. Obwohl versucht wurde, die Patienten bezüglich ihres Alters, Geschlechts und der Nierentransplantatfunktion zu matchen, war dies für die Surrogatparameter GFR und Proteinurie nicht möglich.

Der Vergleich mit vorherigen Studien ist schwierig, da sich unser Patientenkollektiv in Bezug auf Alter, Grunderkrankung sowie den der Nierenschädigung zugrundeliegenden Pathomechanismen von den Kohorten in vorangegangenen Studien unterscheidet. Die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse hinsichtlich der Chemokine differenziert sich durch das untersuchte Medium. So untersuchten wir im Plasma die Chemokinkonzentrationen, während in den von uns zitierten Studien u. a. die Analyse in Nierenbiopsien oder in-vitro-Versuchen erfolgte. Außerdem wurden andere typische Zytokine als in unserer Studie analysiert.

In Anbetracht der aktuellen Studienlage sind nicht ausreichend Studien an langzeittransplantierten Patienten unter Standardimmunsuppression im Vergleich zu Belatacept durchgeführt worden, daher bedarf es weiterer Analysen. Unsere Studie untersuchte erstmalig den Einfluss von CNI, mTORi und Belatacept auf das Chemokinprofil sowie die Biomarker NGAL und Calprotectin.

#### **4.4 Ausblick**

Das Fusionsprotein Belatacept ist im Vergleich zu den konventionellen Immunsuppressiva ein vielversprechendes Agens und zeigt eine verbesserte Nierenfunktion in der Erhaltungstherapie. Im Rahmen der BENEFIT-Studie wurden auch eine geringere Nephrotoxizität sowie ein besseres kardiovaskuläres Risikoprofil bewiesen. Lediglich das häufigere Auftreten akuter Rejektionen unter dem Ko-Stimulationsblocker gegenüber CNI stellt weiterhin eine Herausforderung dar. Daher sollte das Ziel zukünftiger Studien die Immunphänotypisierung von T-Zellen über FACS-Analysen in Kombination mit der spezifischen Zytokinbestimmung sein, um die genauen immunologischen Reaktionen detektieren zu können. Auch gilt es zu klären, ob weitere Ko-Stimulationswege über OX40-OX40L (CD134-CD252), CTLA-Ig oder ICOS-ICOSL bei Belatacept-resistenten Rejektionen von Relevanz sind<sup>77</sup>. Spezifische Zytokine, die mit bestimmten T-Zell-Subpopulationen assoziiert sind, beispielsweise IL-17 für Th17-Zellen oder IL-4, IL-5 und IL-13 für Th1-Zellen, sollten bestimmt werden, um immunologische Prozesse eher nachvollziehen zu können.

Aufgrund ihrer geringen Organspezifität sind Chemokine als alleinige Biomarker zur Beurteilung des Entzündungsgeschehen in der NTx kritisch zu beurteilen. Dennoch stellt die quantitative Analyse von T-Zellen spezifischer Chemokine mit ihren Chemokinrezeptoren eine Möglichkeit dar, zelluläre Rejektionen von nichtimmunologischen Ätiologie einer Transplantatdysfunktion zu unterscheiden. Neben der Infiltration des NTx durch mononuklearen Immunzellen können medikamenten-induzierte Nephrotoxizität, bakterielle oder virale Infektionen und Dehydratation zu einer Transplantatdysfunktion führen<sup>78</sup>. Daher wäre die weitere Erforschung des Chemokinprofils während Rejektionen und chronischen Transplantatdysfunktionen notwendig, um möglichst frühe Veränderungen der NTx im Vergleich zu invasiven histologischen Untersuchungen und klinischen Parametern festzustellen. Gerade im Hinblick auf den Einsatz der unterschiedlichen Immunsuppressiva kann die Anpassung der Immunsuppression eher entschieden werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, durch die Expertise über das spezifische Chemokinprofil in NTx-Patienten neue Zielzellen und T-Zellkommunikationswege anzugreifen und damit eine gezieltere Immunsuppression zu erreichen.

Des Weiteren wäre es von Interesse, den Outcome des Patienten- und Transplantatüberlebens über einen längeren Zeitraum von fünf bis zehn Jahren unter Belatacept gegenüber CNI und mTORi zu beobachten. Dadurch können langfristige Auswirkungen des Therapieregimes auf die NTx-Funktion, das Rejektionsgeschehen und die chronische Transplantatdysfunktion erkannt und eine Evaluation der Immunsuppressiva in der Langzeittherapie ermöglicht werden. Ebenfalls wäre die Beobachtung der GFR mit pNGAL-Konzentration im weiteren Verlauf lohnend.

Im Rahmen des nephrologischen Screenings würden sich frühzeitig detektierbare, renoprotektive, neue Biomarker zur Diagnostik einer NTx-Schädigung positiv auf das Transplantatüberleben auswirken. So sind klassische etablierte Laborparameter, wie das Kreatinin, die Proteinurie oder die GFR, nur bedingt als frühzeitige Warnsysteme heranzuziehen. Neue Biomarker neben dem NGAL und Calprotectin, z. B. KIM-1 (Kidney-Injury-Molecule 1), IL-18, L-FABP (Liver-Type-Fatty-Acid-Binding-Protein), IGFBP7 (IGF-Binding-Protein 7) und TIMP2 (Tissue-Inhibitor-of-Metalloproteinase 2), wurden hinsichtlich ihrer Wertigkeit zur prädiktiven Diagnostik einer akuten Nierenschädigung untersucht. Ihre Adaption in den klinischen Alltag sollte in weiteren Studien evaluiert werden. Auch deren prognostischer Aussagewert für die Nephrotoxizität sowie im Zusammenhang mit Rejektionen, die auf eine komplexe Transplantatpathologie zurückzuführen sind, gilt es zu klären<sup>79</sup>.

Bezüglich der Immunsuppression stellt die Therapie unter Belatacept wegen ihrer besseren Verträglichkeit gegenüber den konventionellen Immunsuppressiva, der Prophylaxe einer akuten Rejektion und weniger Adverse-Events eine vielversprechende Therapieoption dar. Aufgrund der selektiven Ko-Stimulationsblockade kann sie im Vergleich zur konventionellen Immunsuppression spezifischer wirken und hat dadurch den Vorteil einer geringeren Toxizität. Um die klinische Anwendung von Belatacept zu erweitern, gilt es die Indikation auf jene Patienten mit geringerem Risiko einer Belatacept-resistenten Rejektion zu beschränken sowie bei Patienten mit Kontraindikation zur CNI-Therapie Belatacept einzusetzen. Patienten mit hohem Risiko einer Belatacept-resistenten Rejektion könnten weiterhin unter Standardimmunsuppression mit CNI behandelt werden. Um das Risiko einer Belatacept-resistenten Rejektion zu minimieren, wäre auch eine Kombinationstherapie von Belatacept mit CNI oder mTORi in Betracht zu ziehen<sup>80</sup>.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH and Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. In: JAMA: The Journal of the American Medical Association; 1984. p. 2566–71.
2. Deutsche Stiftung Organtransplantation Statistiken zur Organtransplantation [Internet: <https://dso.de/DSO-Infografiken/TX-Niere.png>]. Abgerufen: 25.04.2021
3. Jardine AG, Hartmann A and Holdaas H. Long-term renal allograft survival: a quiet revolution. In: *Kidney international*. Elsevier; 2018. p. 853–5.
4. Coemans M, Süsal C, Döhler B, Anglicheau D, Giral M, Bestard O, Legendre C, Emonds M-P, Kuypers D, Molenberghs G, Verbeke G and Naesens M. Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. In: *Kidney international*. Elsevier; 2018. p. 964–73.
5. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P, Massari P, Mondragon-Ramirez GA, Agarwal M, Di Russo G, Lin C-S, Garg P and Larsen CP. A Phase III Study of Belatacept-based immunosuppression regimens versus Cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT Study). In: *American Journal of Transplantation*. 2010. p. 535–46.
6. Zhao X, Boenisch O, Yeung M, Mfarrej B, Yang S, Turka LA, Sayegh MH, Iacomini J and Yuan X. Critical role of proinflammatory cytokine IL-6 in allograft rejection and tolerance. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. Am J Transplant; 2012. p. 90–101.
7. Banas B and Breidenbach T. *Organspende und Transplantationsmedizin* XXS pocket. Börm Bruckmeier; 2011.
8. Li C and Woo Yang C. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy. In: *Nature Publishing Group*. 2009. p. 513–9.
9. Murphy KM, Weaver C, Janeway C 1943-2003, and Seidler L. *Janeway Immunologie*.
10. Bio-Plex Pro™ Human Chemokine Assays Instruction Manual [Internet: <https://www.bio-rad.com/de-de/product/bio-plex-pro-human-chemokine-assays?ID=MTQTT215>].
11. Zlotnik A and Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. In: *Immunity*. Elsevier; 2012. p. 705–16.
12. Elmoselhi H, Mansell H, Soliman M and Shoker A. Circulating chemokine ligand levels before and after successful kidney transplantation. In: *Journal of inflammation (London, England)*. BioMed Central; 2016. p. 32.

13. Struyf S, Proost P, Vandercappellen J, Dempe S, Noyens B, Nelissen S, Gouwy M, Locati M, Opdenakker G, Dinsart C and Van Damme J. Synergistic up-regulation of MCP-2/CCL8 activity is counteracted by chemokine cleavage, limiting its inflammatory and anti-tumoral effects. In: *European Journal of Immunology*. Wiley-Blackwell; 2009. p. 843–57.
14. Hori T, Naishiro Y, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N, Yamamoto M, Sonoda T, Mizue Y, Imai K, Tsutsumi H and Kokai Y. CCL8 is a potential molecular candidate for the diagnosis of graft-versus-host disease. In: *Blood*. The American Society of Hematology; 2008. p. 4403–12.
15. Nelson PJ and Krensky AM. Chemokines, chemokine receptors and allograft rejection. In: *Immunity*. Elsevier; 2001. p. 377–86.
16. Pardigol A, Forssmann U, Zucht HD, Loetscher P, Schulz-Knappe P, Baggiolini M, Forssmann WG and Mägert HJ. HCC-2, a human chemokine: gene structure, expression pattern, and biological activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences; 1998. p. 6308–13.
17. Hwang J, Kim CW, Son K-N, Han KY, Lee KH, Kleinman HK, Ko J, Na DS, Kwon BS, Gho YS and Kim J. Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 in vitro and in vivo. In: *FEBS Letters*. John Wiley & Sons, Ltd; 2004. p. 47–51.
18. Coulin F, Power CA, Alouani S, Peitsch MC, Schroeder JM, Moshizuki M, Clark-Lewis I and Wells TN. Characterisation of macrophage inflammatory protein-5/human CC cytokine-2, a member of the macrophage-inflammatory-protein family of chemokines. In: *European journal of biochemistry*. *Eur J Biochem*; 1997. p. 507–15.
19. Hughes CE and Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. In: *The FEBS Journal*. 2018. p. 2944–71.
20. Richter R, Forssmann U, Henschler R, Escher S, Frimpong-Boateng A and Forssmann W-G. Increase of expression and activation of chemokine CCL15 in chronic renal failure. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006. p. 1504–12.
21. ZHOU Y, CAO H-B, LI W-J and ZHAO L. The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 chemokine axis: Oncogenic properties, molecular targeting and synthetic and natural product CXCR4 inhibitors for cancer therapy. In: *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2018. p. 801–10.
22. Vazquez-Mellado MJ, Monjaras-Embriz V and Rocha-Zavaleta L. Erythropoietin, Stem Cell Factor, and Cancer Cell Migration. In: *vitamins and hormones*. Academic Press; 2017. p. 273–96.
23. Mihai S, Codrici E, Popescu ID, Enciu AM, Albuлесcu L, Necula LG, Mambet C, Anton G and Tanase C. Inflammation-related mechanisms in chronic kidney disease prediction, progression, and outcome. In: *Journal of Immunology Research*. 2018.
24. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe

- F, Manz R, Radbruch A and Dörner T. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. In: *Blood*. 2005. p. 1614–21.
25. Rice JB, White AG, Scarpati LM, Wan G and Nelson WW. Long-term Systemic Corticosteroid Exposure: A Systematic Literature Review. In: *Clinical Therapeutics*. Excerpta Medica Inc.; 2017. p. 2216–29.
  26. Ordóñez-Robles M, Santos-Beneit F and Martín JF. Unraveling Nutritional Regulation of Tacrolimus Biosynthesis in *Streptomyces tsukubaensis* through omic Approaches. In: *Antibiotics* (Basel, Switzerland). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2018.
  27. Murphy K, and Weaver C. *Janeway's Immunobiology*, 9th edition. 2016.
  28. Naesens M, Kuypers DRJ and Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. In: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. *Clin J Am Soc Nephrol*; 2009. p. 481–508.
  29. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, Nankivell BJ, Halloran PF, Colvin RB, Akalin E, Alachkar N, Bagnasco S, Bouatou Y, Becker JU, Cornell LD, Duong van Huyen JP. The Banff 2017 kidney meeting report: revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. In: *American Journal of Transplantation*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 293–307.
  30. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR and Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: Meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. In: *British Medical Journal*. BMJ Publishing Group; 2005. p. 810–4.
  31. Zwart ES, Yüksel E, Pannekoek A, de Vries R, Mebius RE and Kazemier G. De novo carcinoma after solid organ transplantation to give insight into carcinogenesis in general - a systematic review and meta-analysis. In: *Cancers*. MDPI AG; 2021. p. 1–13.
  32. Ducloux D, Motte G, Kribs M, Abdelfatah AB, Bresson-Vautrin C, Rebibou JM and Chalopin JM. Hypertension in renal transplantation: Donor and recipient risk factors. In: *Clinical Nephrology*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle; 2002. p. 409–13.
  33. Roland M, Gatault P, Doute C, Büchler M, Al-Najjar A, Barbet C, Chatelet V, Marlière JF, Nivet H, Lebranchu Y and Halimi JM. Immunosuppressive medications, clinical and metabolic parameters in new-onset diabetes mellitus after kidney transplantation. In: *Transplant International*. *Transpl Int*; 2008. p. 523–30.
  34. Malvezzi P and Rostaing L. The safety of calcineurin inhibitors for kidney-transplant patients. In: *Expert Opinion on Drug Safety*. Informa Healthcare; 2015. p. 1531–46.
  35. Singh N. Infectious complications in organ transplant recipients with the use of calcineu-

- rin-inhibitor agent-based immunosuppressive regimens [Internet]. In: *Current Opinion in Infectious Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins; 2005. p. 342–5.
36. Vézina C, Kudelski A and Sehgal SN. Rapamycin (AY-22, 989) a new antifungal antibiotic. In: *The journal of antibiotics*. 1975.
  37. Faivre S, Kroemer G and Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anti-cancer agents. In: *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2006. p. 671–88.
  38. Weichhart T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. In: *Gerontology*. Karger Publishers; 2018. p. 127–34.
  39. Danovitch GM. *Handbook of kidney transplantation*. Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
  40. Klawitter J, Nashan B and Christians U. Everolimus and sirolimus in transplantation-related but different. In: *Expert Opinion on Drug Safety*. Informa Healthcare; 2015. p. 1055–70.
  41. Li J, Kim SG and Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. In: *cell metabolism*. NIH Public Access; 2014. p. 373–9.
  42. Budde K, Lehner F, Sommerer C, Arns W, Reinke P, Eisenberger U, Wüthrich RP, Scheidl S, May C, Paulus E-M, Mühlfeld A, Wolters HH, Pressmar K, Stahl R and Witzke O. Conversion from cyclosporine to everolimus at 4.5 months posttransplant: 3-year results from the randomized ZEUS study. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012. p. 1528–40.
  43. Budde K, Zeier M, Witzke O, Arns W, Lehner F, Guba M, Jacobi J, Kliem V, Reinke P, Hauser IA, Vogt B, Stahl R, Rath T, Duerr M, Paulus E-M, May C, Porstner M and Sommerer C. Everolimus with cyclosporine withdrawal or low-exposure cyclosporine in kidney transplantation from Month 3: a multicentre, randomized trial. In: *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2017. p. 1060–70.
  44. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Strobert E, Anderson D, Cowan S, Price K, Naemura J, Emswiler J, Greene J, Turk LA, Bajorath J, Townsend R, Hagerty D, Linsley PS and Peach RJ. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. In: *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. *Am J Transplant*; 2005. p. 443–53.
  45. Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, Vincenti F, Garcia VD, Campistol J, del Carmen Rial M, Florman S, Block A, Di Russo G, Xing J, Garg P and Grinyó J. A Phase III Study of Belatacept Versus Cyclosporine in Kidney Transplants from Extended Criteria Donors (BENEFIT-EXT Study). In: *American Journal of Transplantation*. 2010. p. 547–57.
  46. Noto A, Cibecchini F, Fanos V and Mussap M. NGAL and metabolomics: the single bi-

- omarker to reveal the metabolome alterations in kidney injury. In: *BioMed research international*. Hindawi Limited; 2013. p. 612032.
47. Mårtensson J and Bellomo R. The Rise and Fall of NGAL in Acute Kidney Injury. In: *Blood Purification*. Karger Publishers; 2014. p. 304–10.
  48. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P and Barasch J. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. American Society of Nephrology; 2007. p. 407–13.
  49. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J and Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. In: *The Lancet*. Elsevier; 2005. p. 1231–8.
  50. Hall IE, Yarlagadda SG, Coca SG, Wang Z, Doshi M, Devarajan P, Han WK, Marcus RJ and Parikh CR. IL-18 and Urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation. In: *J Am Soc Nephrol*. 2010. p. 189–97.
  51. Halloran PF and Hunsicker LG. Delayed Graft Function: State of the Art, November 10–11, 2000. Summit Meeting, Scottsdale, Arizona, USA. In: *American Journal of Transplantation*. John Wiley & Sons, Ltd; 2001. p. 115–20.
  52. Cowland JB and Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. In: *Genomics*. Academic Press; 1997. p. 17–23.
  53. Buemi A, Musuamba F, Frederic S, Douhet A, De Meyer M, De Pauw L, Darius T, Kanaan N, Wallemacq P and Mourad M. Is plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) determination in donors and recipients predictive of renal function after kidney transplantation? In: *Clinical biochemistry*. *Clin Biochem*; 2014. p. 68–72.
  54. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ and Geczy CL. Functions of S100 proteins. In: *Current molecular medicine*. NIH Public Access; 2013. p. 24–57.
  55. Dessing MC, Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM, Van Der Poll T, Yang H, Tracey KJ, Nawroth PP, Bierhaus A, Florquin S and Leemans JC. Fax +41 61 306 12 34 E-Mail karger@karger.ch RAGE does not contribute to renal injury and damage upon ischemia/reperfusion-induced injury. In: *J Innate Immun*. 2012. p. 80–5.
  56. D'Agati V and Schmidt AM. RAGE and the pathogenesis of chronic kidney disease. In: *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group; 2010. p. 352–60.
  57. Zhang PL, Lun M, Schworer CM, Blasick TM, Masker KK, Jones JB and Carey DJ. Heat shock protein expression is highly sensitive to ischemia-reperfusion injury in rat kidneys. 2008.
  58. Chen J-J, Fan P-C, Kou G, Chang S-W, Chen Y-T, Lee C-C and Chang C-H. Meta-

- Analysis: Urinary Calprotectin for discrimination of intrinsic and prerenal acute kidney injury. In: *Journal of Clinical Medicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019. p. 74.
59. Heller F, Frischmann S, Grünbaum M, Zidek W and Westhoff TH. Urinary Calprotectin and the distinction between prerenal and intrinsic acute kidney injury. In: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2011. p. 2347–55.
  60. Ebbing J, Seibert FS, Pagonas N, Bauer F, Miller K, Kempkensteffen C, Günzel K, Bachmann A, Seifert HH, Rentsch CA, Ardelt P, Wetterauer C Amico P, Babel N and Westhoff TH. Dynamics of Urinary Calprotectin after renal ischaemia. In: *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2016.
  61. Burkhardt K, Radespiel-Troger M, Troger T, Rupprecht HD, Goppelt-Struebe M, Riess R, Renders L, Hauser IA and Kunzendorf U. An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection. 2001.
  62. Tepel M, Borst C, Bstrup C, Marcussen N, Pagonas N, Seibert FS, Arndt R, Zidek W, and Westhoff TH. Urinary Calprotectin and posttransplant renal allograft injury. In: Stepkowski S, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2014. p. e113006.
  63. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T and Coresh J. A new equation to estimate glomerular filtration rate. In: *Annals of internal medicine*. 2009. p. 604–12.
  64. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS and Turka LA. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. In: *The Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press; 1995. p. 1869–74.
  65. Schweitzer AN and Sharpe AH. Production restimulation of Th2 but not Th1 cytokine B7 molecules during priming versus B7-2 (CD86) show distinct requirements for lacking expression of both B7-1 (CD80) and studies using antigen-presenting cells. 1998. p. 2762–2771.
  66. Piccotti JR, Chan SY, VanBuskirk AM, Eichwald EJ and Bishop DK. Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious, or irrelevant in promoting allograft survival? In: *Transplantation*. Transplantation; 1997. p. 619–24.
  67. Locati M, Bonecchi R and Corsi MM. Chemokines and Their Receptors. In: *Pathology Patterns Reviews*. Oxford Academic; 2005. p. S82–95.
  68. Mathews D V, Wakwe WC, Kim SC, Lowe MC, Breeden C, Roberts ME, Farris AB, Strobert EA, Jenkins JB, Larsen CP, Ford ML, Townsend R and Adams AB. Belatacept-resistant rejection is associated with CD28+ memory CD8 T Cells. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. *Am J Transplant*; 2017. p. 2285–99.
  69. Grimbert P, Audard V, Diet C, Matignon M, Plonquet A, Mansour H, Desvaux D, Dur-

- rbach A, Cohen JL and Lang P. T-cell phenotype in protocol renal biopsy from transplant recipients treated with belatacept-mediated co-stimulatory blockade. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. Nephrol Dial Transplant*; 2011. p. 1087–93.
70. Gaston RS. Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity: reflections on an evolving paradigm. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN. American Society of Nephrology*; 2009. p. 2029–34.
  71. Xu H, Perez SD, Cheeseman J, Mehta AK and Kirk AD. The allo- and viral-specific immunosuppressive effect of belatacept, but not tacrolimus, attenuates with progressive T cell maturation. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. NIH Public Access*; 2014. p. 319–32.
  72. Imamura T, Kinugawa K, Doi K, Hatano M, Fujino T, Kinoshita O, Nawata K, Noiri E, Kyo S and Ono M. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin and worsening renal function during everolimus therapy after heart transplantation. In: *International heart journal. Int Heart J*; 2015. p. 73–9.
  73. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Taranta-Janusz K and Michaluk-Skutnik J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of cyclosporine nephrotoxicity? In: *Pediatric nephrology (Berlin, Germany). Pediatr Nephrol*; 2010. p. 889–97.
  74. Diekmann F, Budde K, Slowinski T, Oppenheimer F, Fritsche L, Neumayer HH and Campistol JM. Conversion to sirolimus for chronic allograft dysfunction: long-term results confirm predictive value of proteinuria. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. Transpl Int*; 2008. p. 152–5.
  75. 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 and Grinyó J. Switching from calcineurin inhibitor-based regimens to a belatacept-based regimen in renal transplant recipients: a randomized phase II study. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN. American Society of Nephrology*; 2011. p. 430–9.
  76. Brakemeier S, Kannenkeril D, Dürr M, Braun T, Bachmann F, Schmidt D, Wiesener M and Budde K. Experience with belatacept rescue therapy in kidney transplant recipients. In: *Transplant International*. 2016. p. 1184–95.
  77. Noble J, Jouve T, Janbon B, Rostaing L, and Malvezzi P. Belatacept in kidney transplantation and its limitations. In: *Expert review of clinical immunology. Expert Rev Clin Immunol*; 2019. p. 359–67.
  78. Lo DJ, Weaver TA, Kleiner DE, Mannon RB, Jacobson LM, Becker BN, Swanson SJ, Hale DA and Kirk AD. Chemokines and their receptors in human renal allotransplantation. In: *Transplantation. NIH Public Access*; 2011. p. 70.
  79. Schrezenmeier E V, Barasch J, Budde K, Westhoff T, and Schmidt-Ott KM. Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance. In: *Acta physi-*

ologica (Oxford, England). NIH Public Access; 2017. p. 554–72.

80. van der Zwan M, Hesselink DA, van den Hoogen MWF and Baan CC. Costimulation blockade in kidney transplant recipients. In: *Drugs*. Springer; 2020. p. 33–46.

## **VI Eidesstaatliche Erklärung**

„Ich, Laili Anwari, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung des Zytokinprofils und der Biomarker an nierentransplantierten Patienten nach Umstellung auf Belatacept / Examination of the cytokine profile and biomarkers in kidney transplant patients after 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](http://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: 25.04.2021

Unterschrift:

## **VII Lebenslauf**

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

## VIII Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Klemens Budde, der mir durch seine konstruktive Kritik neue Anregungen zur Auseinandersetzung mit dem Thema bot. Insbesondere meinem Betreuer Herr Dr. Michael Dürr, der mich bei der Umsetzung der gesamten Arbeit unterstützt hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand, bin ich dankbar.

Bei Prof. Christine Falk möchte ich mich für die Durchführung und Bereitstellung der labormedizinischen Daten und den fachlichen Austausch zu Multiplex Analysen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei den Laborassistent\*innen Christine Lorkowski, Katharina Fabritius und Marco Mai bedanken. Sie haben mich fortwährend im praktischen Teil meiner Arbeit fachlich und sozial kompetent beraten.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, meinen Geschwistern, meinen Freunden sowie meinen Arbeitskolleg\*innen für ihre Geduld, ihre stetige Motivation und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.